

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO-
CIRÚRGICAS**

JOAQUIM JOSÉ DE LIMA SILVA

**AÇÕES DO ÁCIDO CAURENÓICO E DA L-ARGININA SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO E A INFLAMAÇÃO EM RETALHOS CUTÂNEOS RANDOMIZADOS
EM RATOS.**

FORTALEZA

2015

JOAQUIM JOSÉ DE LIMA SILVA

AÇÕES DO ÁCIDO CAURENÓICO E DA L-ARGININA SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO E A INFLAMAÇÃO EM RETALHOS CUTÂNEOS RANDOMIZADOS EM
RATOS

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências M da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Botelho
Guimarães

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- S58a Silva, Joaquim José de Lima.
Ações do ácido caurenóico e da L-Arginina sobre o estresse oxidativo e a inflamação em retalhos cutâneos randomizados em ratos/ Joaquim José de Lima Silva. - 2015.
121 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães.
1. Estresse Oxidativo. 2. Antioxidantes. 3. Anti-Inflamatórios. 4. Retalhos Cirúrgicos. I.
Título.

CDD 617

JOAQUIM JOSÉ DE LIMA SILVA

AÇÕES DO ÁCIDO CAURENOICO E DA L-ARGININA SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO E A INFLAMAÇÃO EM RETALHOS CUTÂNEOS RANDOMIZADOS EM RATOS.

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Cirurgia.

Aprovada em 31/07/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Antônio Ribeiro da Silva Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Mauro Mendes Gifoni
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Jesus Misericordioso, pelo dom da vida; por me acompanhar em todos os momentos, com amor com paciência; por mais essa etapa.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Sérgio Botelho Guimarães, pela orientação e paciência durante todo o período desse estudo.

Ao Professor Doutor Krishnamurti de Moraes Carvalho, Coordenador do Laboratório de Farmacologia Clínica e Molecular da Universidade Estadual do Ceará, pelo fornecimento da L-Arginina, utilizada nesse experimento.

À Professora Doutora Nilce Viana Gramosa, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, pelo fornecimento do ácido caurenóico, utilizado nesse experimento

À Professora Doutora Antoniella Souza Gomes Duarte, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, pela análise dos retalhos de pele dos animais do presente estudo.

À Professora Doutora Gerly Anne de Castro Brito, do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio para a análise dos retalhos de pele dos animais do presente estudo.

Ao Dr. José Lima de Carvalho Rocha, reitor do Centro Universitário Christus-Unichristus, por ter cedido o laboratório de cirurgia experimental.

Ao Sr. Felipe Silva Maciel, coordenador dos laboratórios de saúde da Unichristus, pelo apoio ao meu experimento

À Débora Gramosa Pompeu, aluna do curso de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, pela extração do ácido caurenóico no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica.

À Naiara Coelho Ximenes, estudante do curso de Farmácia e estagiária no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, pelo preparo das substâncias utilizadas nesse experimento

Aos brilhantes estudantes de medicina do Centro Universitário Christus, pela participação na fase experimental desse estudo.

Às Senhoras Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenele, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, pela competência, dedicação e atenção dispensados aos alunos de pós-graduação.

“Minha alma glorifica ao Senhor, meu espírito exulta de alegria em Deus, meu Salvador, porque olhou para sua pobre serva. Por isto, desde agora me proclamam bem-aventurada todas as gerações, porque realizou em mim maravilhas aquele que é poderoso e cujo nome é Santo. Sua misericórdia se estende, de geração em geração, sobre os que o temem”.
Lc 1,46-50.

RESUMO

O efeito protetor do ácido caurenóico e da L-Arginina sobre o estresse oxidativo e a inflamação foi avaliado, utilizando um modelo experimental de isquemia-reperfusão de retalho cutâneo randomizado no dorso de ratos. Cinquenta e quatro ratos, Wistar, jovens, com peso médio de 267,2 g, foram distribuídos ao acaso, em três grupos (GC - controle salina, AK – grupo ácido caurenóico, GA – grupo L-Arginina), numericamente iguais e posteriormente redistribuídos em três subgrupos (T-0, T-1 e T-2), com seis animais cada. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados sob os efeitos de anestesia geral, utilizando-se de uma associação do cloridrato de ketamina (90 mg/kg) com xilazina (10mg/kg), administrados por via intra-peritoneal. Os animais pertencentes aos grupos controle e ácido caurenóico receberam as drogas utilizadas nesse estudo por via oral (gavagem); enquanto que, o grupo L-arginina, por via intraperitoneal, 2 horas antes do experimento, no tempo T-1, uma dose pós-operatória e no tempo T-2, seis doses pós-operatórias. Foram determinadas as concentrações de IL-1 β , TNF- α , MDA, GSH, a relação Nitrito/Nitrato (Nox) e a atividade da MPO no tecido. Para determinação do padrão de distribuição das amostras utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram apresentados como média \pm SEM. ANOVA seguida pelo teste de Dunnett, foi utilizada para avaliação estatística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. O ácido caurenóico reduziu significativamente as concentrações IL-1, decorridas 24h e 48h da construção do retalho cutâneo randomizado; bem como, de TNF α , decorridas 24h e 48h, demonstrando atividade anti-inflamatória. O ácido caurenóico promoveu diminuição significativa da concentração de MDA decorridas 24/48h, demonstrando atividade antilipoperoxidativa. O ácido caurenóico promoveu diminuição significativa da atividade de MPO, decorridas 24h/48h, evidenciando atividade anti-inflamatória. O ácido caurenóico e a L-arginina promoveram a diminuição significativa da relação nitrito/nitrato, decorridas 24h, demonstrando atividade antioxidante. No entanto, a L-arginina promoveu aumento significativo da relação nitrito/nitrato decorridas 168h, evidenciando atividade pró-oxidante. Conclui-se que o ácido caurenóico apresenta ação antilipoperoxidativa, intensa ação antioxidante e atividade anti-inflamatória; enquanto a L-arginina apresenta ação antilipoperoxidativa e antioxidante, durante a isquemia e reperfusão de retalho cutâneo randomizado em dorso de ratos.

Palavras-chaves: Estresse Oxidativo. Antioxidantes. Anti-Inflamatórios. Retalhos Cirúrgicos.

ABSTRACT

The protective effect of kaurenoic acid (KA) and of L-arginine (LA) on the oxidative stress and inflammation was evaluated using an experimental model of ischemia-reperfusion of randomized skin flaps on the back of rats. Fifty-four young Wistar rats, average weight 267,2 g, were distributed randomly in three groups (GC-saline control, AK-kaurenoic acid group, GA – L-arginine group), numerically equal and subsequently redistributed into three subgroups (T-0, T-1 and T-2) with six animals each. All surgical procedures were performed under general anesthesia, using a combination of ketamine hydrochloride (90 mg/kg) with xylazine (10mg/kg), administered intraperitoneally.(ip). Groups GC and KA rats received the drugs used in this study by gavage; GA rats received LA ip. Treatments were provided 2: hours before the experiment (T0) and 24h (T1). T3 rats (168 h) received daily (6) doses of KA, until sacrifice. Skin concentrations of IL-1 β , TNF- α , MDA, GSH, MPO, Nitrite/Nitrate (Nox) ratio and MPO activity were assayed.. The Kolmogorov-Smirnov test was used for determination of the distribution pattern of the samples. The data are presented as mean \pm SE. ANOVA followed by the Dunnett test, were used for statistical evaluation. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. KA promoted a significant reduction of IL-1, TNF α and MDA concentrations, after 24/48 h of randomized cutaneous flap construction demonstrating anti-inflammatory and antiperoxidative activities. LA promoted significant decrease of MDA concentration at T1 timepoint, and a significant increase in GSH concentration in 24/48 h timepoints, demonstrating its antiperoxidative and antioxidant activities. KA also promoted a significant increase in GSH concentrations after 24/48h. KA promoted significant decrease of MPO activity after 24h/48h, showing anti-inflammatory activity. KA and LA promoted a significant decrease of the nitrite/nitrate ratio at T1, showing antioxidant activity. However, at 168 h timepoint the use of LA promoted significant increase of nitrite/nitrate ratio, demonstrating a pro-oxidant activity. It is concluded that KA presents antiperoxidative action and intense antioxidant and anti-inflammatory activity while LA presents antiperoxidative and antioxidant action, during ischemia and reperfusion of randomized cutaneous flap rats.

Keywords: Oxidative Stress. Antioxidants. Anti-Inflammatory Agents. Surgical Flaps.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Copaifera <i>langsdorffii</i> Desf	25
Figura 2	Estrutura química do ácido caurenóico	28
Figura 3	Estrutura química da L-arginina	33
Figura 4	Distribuição dos grupos e subgrupos	37
Figura 5	Desenho do estudo	38
Figura 6	Demarcação do retalho cutâneo no dorso do rato 01 do GC	40
Figura 7	Retalho cutâneo suturado, no dorso do rato 02 do GC	40
Figura 8	Retalho cutâneo no dorso do rato, no 7 ^o . dia de pós-operatório, evidenciando necrose distal, do grupo controle salina (solução salina)	41
Figura 9	Retalho cutâneo no dorso do rato, no 7 ^o . dia de pós-operatório, evidenciando necrose distal, do grupo ácido caurenóico	41
Figura 10	Retalho cutâneo no dorso do rato, no 7 ^o . dia de pós-operatório, evidenciando necrose distal, do grupo L-arginina	41
Figura 11	Fluxograma do experimento	42
Figura 12	Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre as concentrações de IL-1 na pele (pg/mg) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado	49
Figura 13	Efeitos do ácido caurenóico, da l-arginina sobre as concentrações de IL-1 na pele (pg/mg) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 48h da construção do retalho cutâneo randomizado	50
Figura 14	Efeitos do ácido caurenóico, da l-arginina sobre as concentrações de IL-1 na pele (pg/mg) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 168h da construção do retalho cutâneo randomizado	50
Figura 15	Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre as concentrações de TNF α na pele (pg/mL) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado	51
Figura 16	Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre as concentrações de TNF α na pele (pg/mL) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 48h da construção do retalho cutâneo randomizado	52
Figura 17	Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre as concentrações de TNF α na pele (pg/mL) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 168h da construção do retalho cutâneo randomizado	52
Figura 18	Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre as concentrações de MDA na pele (μ mol/tecido) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado	53
Figura 19	Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre as concentrações de MDA na pele (μ mol/tecido) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 48h da construção do retalho cutâneo randomizado	54

Figura 20	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre as concentrações de MDA na pele ($\mu\text{mol}/\text{tecido}$) de ratos saudios comparados ao controle (GC), decorridas 168h da construção do retalho cutâneo randomizado	54
Figura 21	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre as concentrações de tiois não proteicos (NPSH) na pele (nmol de NPSH/mg de proteína) de ratos saudios comparados ao controle (GG), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado	55
Figura 22	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre as concentrações de tiois não proteicos (NPSH) na pele (nmol de NPSH/mg de proteína) de ratos saudios comparados ao controle (GG), decorridas 48h da construção do retalho cutâneo randomizado	56
Figura 23	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre as concentrações de tiois não proteicos (NPSH) na pele (nmol de NPSH/mg de proteína) de ratos saudios comparados ao controle (GG), decorridas 168h da construção do retalho cutâneo randomizado	56
Figura 24	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre atividade de MPO, na pele (U MPO/g tecido) de ratos saudios comparados ao controle (GC), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado	57
Figura 25	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre atividade de MPO, na pele (U MPO/g tecido) de ratos saudios comparados ao controle (GC), decorridas 48h da construção do retalho cutâneo randomizado	58
Figura 26	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre atividade de MPO, na pele (U MPO/g tecido) de ratos saudios comparados ao controle (GC), decorridas 168h da construção do retalho cutâneo randomizado	58
Figura 27	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre a relação nitrito/nitrato na pele (μM) de ratos saudios comparados ao controle (GC), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado	59
Figura 28	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre a relação nitrito/nitrato na pele (μM) de ratos saudios comparados ao controle (GC), decorridas 48h da construção do retalho cutâneo randomizado	60
Figura 29	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre a relação nitrito/nitrato na pele (μM) de ratos saudios comparados ao controle (GC), decorridas 168 h da construção do retalho cutâneo randomizado	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso médio dos ratos utilizados no estudo	48
Tabela 2	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre as concentrações de IL-1 na pele (pg/mg) de ratos saudios comparados ao respectivo controle (GC), decorridas 24h, 48 e 168h da construção do retalho cutâneo randomizado	49
Tabela 3	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre as concentrações de TNF α na pele (pg/mL) de ratos saudios comparados ao controle (GC), decorridas 24h, 48 e 168 h da construção do retalho cutâneo randomizado	51
Tabela 4	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre as concentrações de MDA na pele (μ mol/tecido) de ratos saudios comparados ao controle (GG), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado	53
Tabela 5	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre as concentrações de tiois não proteicos (NPSH) na pele (nmol de NPSH/mg de proteína) de ratos saudios comparados ao controle (GG), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado	55
Tabela 6	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre a atividade da MPO na pele (U MPO/g tecido) de ratos saudios comparados ao controle (GG), decorridas 24h/48h/168h da construção do retalho cutâneo randomizado	57
Tabela 7	Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre a relação nitrito/nitrato na pele (uM) de ratos saudios comparados ao controle (GC), decorridas 24h, 48 e 168h da construção do retalho cutâneo randomizado	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA	– Dimetilarginina assim ética
AK	– Grupo ácido caurenóico
ARNm	– RNA mensageiro
ATP	– Trifosfato de adenosina
CAT	– Catalase
CEPA	– Comissão de Ética em Pesquisa Animal
cGMP	– Monofosfato guanosina cíclico
CIOMS	– Council for International Organization of Medical Sciences
CO ₂	– Gás carbônico
COBEA	– Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DNA	– Ácido desoxirribonucléico
DTNB	– Reagente de Ellman
DTNB	– (5,5'-dithio-bis -2- ácido nitrobenzóico)
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNos	– Óxido nítrico sintase endotelial
ERN	– Espécies Reativas do Nitrogênio
ERO	– Espécies Reativas de Oxigênio
FTC β	– Fator transformador de crescimento β
GA	– Grupo L-arginina
GC	– Grupo controle salina
GC	– Cromatografia gasosa
GO	– Glutaciona oxidase
GPx	– Glutaciona Peroxidase
GSH	– Glutaciona reduzida
GSH/g	– Glutaciona reduzida por grama
GSH-Px	– Glutaciona peroxidase
GSHR	– Dissulfetos mistos de glutaciona
GSOH	– Sulfônicos
GSOH	– Ácidos sulfínico
GSSG	– Glutaciona dissulfeto

GSSO ₃ H	– S-sulfoglutationa
GSTs	– Glutathionas transferases
H ₂ O	– Água
H ₂ O ₂	– Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	– Ácido sulfúrico
H ₃ PO ₄	– Ácido fosfórico
HHT	– Hydroxiheptadecatrienoato
HNO ₂	– Ácido nitroso
HO•	– Hidroxila
I/R	– Isquemia/reperfusão
ICAM-1	– Anticorpo monoclonal para molécula de adesão intercelular 1
IL-1 β	– Interleucina 1 β
iNOS	– Óxido nítrico sintase induzível
KCL	– Cloreto de potássio
LC	– Cromatografia líquida
M	– Mol
MDA	– Malondialdeído
ME / CFS	– Encefalomielite miálgica / síndrome da fadiga crônica
MG	– Metilglioxal
MPO	– Mieloperoxidase
MPO/mg	– Mieloperoxidase por miligrama
N ₂ O ₃	– Óxido nítrico
NEED	– (N-1-naftiletilenodiamina)
NF κ B	– Fator nuclear kappa B
NF-kB	– Fator Nuclear k-B
NMDA	– N-methylDaspartate
nmol/g	– Nanomol/grama
nNOS	– Óxido nítrico sintase constitutiva neuronal
NO	– Óxido nítrico
NO•	– Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	– Nitrito
NO ₃ ⁻	– Nitrato
NOS	– Óxido nítrico sintase
Nox	– Relação nitrito/nitrato

NPSH	–	Tiois não protéicos
Nrf2	–	Fator eritróide nuclear
O ₂	–	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	–	Superóxido
°C	–	Graus centrígrados
ONOO ⁻	–	Peroxinitrito
pg/mL	–	Picograma por mililitro
PGE2	–	Prostaglandina E2
PGH2	–	Prostaglandina H2
pH	–	Potencial de hidrogênio
pKa	–	Solução tampão
RNA	–	Ácido ribonucléico
RNS	–	Espécies reativas de nitrogênio
RO [•]	–	Alcoxila
ROO [•]	–	Peroxila
ROS	–	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	–	Superóxido dismutase
SOD2	–	Sulfóxido Dismutase
SP	–	Substância-P
TBA	–	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	–	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	–	Ácido tricloroacético
TNF-α	–	Fator de necrose tumoral α
U	–	Unidade
USA	–	Estados Unidos da América
VO	–	Via oral
μM	–	Micro mol
μg	–	Micrograma
μl	–	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVO	35
3	MÉTODO	36
3.1	Desenho do Estudo	38
3.2	O Estudo	39
3.2.1	Substâncias utilizadas	42
3.2.2	Coleta do material para análises Laboratoriais	43
3.2.3	Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) no retalho cutâneo de ratos	43
3.2.4	Determinação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH) no retalho cutâneo de ratos	44
3.2.5	Determinação da concentração de mieloperoxidase (MPO) no retalho cutâneo de ratos	44
3.2.6	Dosagem de TNF- α , IL-1 β no retalho cutâneo de ratos	45
3.2.7	Dosagem Nitrito/Nitrato no retalho cutâneo de ratos	46
3.3	Análise Estatística	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Perdas de animais	48
4.2	Pesos dos ratos	48
4.3	Efeitos da isquemia/reperfusão em retalhos cutâneos randomizados ..	49
4.3.1	Efeitos sobre a expressão de IL-1 na pele dos ratos	49
4.3.2	Efeitos sobre a expressão de TNF α na pele dos ratos	51
4.3.3	Efeitos sobre a concentração de MDA na pele dos ratos	53
4.3.4	Efeitos sobre a concentração de tiois não protéicos - (NPSH) na pele dos ratos	55
4.3.5	Efeitos sobre a atividade da MPO na pele dos ratos	57
4.3.6	Efeitos sobre a relação nitrito/nitrato na pele dos ratos	59
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICES	118
	ANEXOS	122

1 INTRODUÇÃO

A restauração das perdas cutâneas, decorrentes de trauma, ressecção tumoral, infecções e/ou necrose por isquemia, continua sendo um grande desafio para a cirurgia plástica, no que diz respeito à manutenção da função e ao aspecto estético. A restauração atinge seu maior grau de dificuldade, quando a área a ser recoberta é extensa ou se localiza em região nobre, como por exemplo, a face. Para a cobertura dessas áreas cruentas, lança-se mão dos retalhos de pele. No entanto, a viabilidade desses retalhos é diretamente relacionada à sua vascularização que, pode ser a partir de uma artéria conhecida, sendo denominado retalho axial, ou confeccionado ao acaso, o retalho randomizado. Estes últimos são mais propensos à necrose, devido à ausência, algumas vezes, de fonte arterial suficientemente capaz de nutrir todo o retalho. Existe, portanto, uma grande dificuldade, em se determinar o tamanho do retalho de pele randomizado, no que concerne à segurança da sua vascularização e, conseqüentemente, a sua viabilidade. No início, era mantida uma relação comprimento X largura, de 1:1, sendo, posteriormente, modificada de acordo com a área operada. Todavia, sabe-se que a necrose desses retalhos está relacionada a fatores extrínsecos e intrínsecos, sendo o fluxo sanguíneo, o principal fator intrínseco e a causa mais frequente de perdas desses retalhos, por constituir a fonte de sua nutrição. Os fatores extrínsecos, por sua vez, são classificados em sistêmicos (hipotensão, arteriopatas e infecção); locais (temperatura, compressão e tensão) e os técnicos (planejamento e execução). (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2000; CAMPOS *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Alguns estudos experimentais em ratos demonstraram que o tempo necessário para a formação do pedículo secundário ocorre em torno de nove dias. O surgimento de hematoma, edema e a própria relação do pedículo versus a área desse pedículo podem acarretar necrose da porção distal do retalho em porcentagens que variam de 9% a 65%, de acordo com o modelo experimental testado (ALMEIDA *et al.*, 2004).

A necrose de um retalho de pele é uma importante complicação da técnica cirúrgica, de caráter irreversível resultando em perda parcial ou total do retalho. Múltiplos são os fatores envolvidos e as causas básicas são a congestão venosa e a insuficiência arterial. No entanto, vários são os fatores que atuam durante o processo de isquemia: algumas substâncias vasoativas causam vasoespasmo;

ocorre a produção de radicais livres; a bomba de sódio e potássio é inativada; surge edema das células endoteliais ocasionando trombose arterial e venosa. (BITTENCOURT *et al.*, 2005). A agressão isquêmica ocasionada durante a elevação do retalho não é um determinante consistente capaz de conduzir a necrose do mesmo, tendo em vista que, estudos prévios sugerem que a maioria dos tecidos consegue sobreviver com uma média de 10% do seu aporte sanguíneo. Entretanto, algumas mudanças fisiopatológicas referentes à vasoconstrição podem comprometer a viabilidade do retalho. Como exemplo, a liberação de tromboxano A2 pelas plaquetas e o acúmulo de metabólitos tóxicos da vasoconstrição que podem causar lesão tecidual induzida por radicais livres. (HART *et al.*, 2006).

Entretanto, a necrose da parte distal dos retalhos de pele constitui um problema não solucionado, ainda hoje, em cirurgia plástica reparadora e estética. Após a necrose do retalho, a deiscência da ferida cirúrgica, a infecção, a cicatrização retardada da ferida e a formação de fístulas, são complicações secundárias comuns, agravadas por defeitos estéticos e funcionais resultantes de tentativas não bem sucedidas de correção do problema. (HART *et al.*, 2006).

A literatura pesquisada é rica em estudos experimentais em ratos, utilizando modelos de retalhos cutâneos, sejam confeccionados no dorso ou na parte ventral do animal. Muitos retalhos cutâneos randomizados do dorso de ratos têm como base o trabalho de McFarlane (1965), onde era confeccionado um retalho retangular, de base cranial, medindo 10cm de comprimento por 4cm de largura. A partir dessa publicação surgiram outros trabalhos, onde são utilizados retalhos semelhantes, sofrendo modificações nas dimensões ou na base do retalho descrito anteriormente. Outros autores publicaram retalhos da face ventral do animal, denominados retalhos epigástricos. Dentre as várias publicações existentes, observa-se: retalho cutâneo dorsal, de base caudal, medindo 10 X 3cm (GHAVAMI; NUTT; HARDY, 2002), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 6 X 2cm (HUEMER *et al.*, 2003), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 4cm (FREIRE *et al.*, 2003), retalho cutâneo dorsal, de base caudal, medindo 10 X 3cm (ZHANG *et al.*, 2003), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 3cm (MCDONALD *et al.*, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 12 X 3cm (TYNER *et al.*, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base caudal, medindo 8 X 2,5 cm (SARIFAKIOGLU *et al.*, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 8 X 2cm (ALMEIDA *et al.*, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X

4cm (ESTEVEES-JÚNIOR; FERREIRA; LIEBANO, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 4cm (FONSECA *et al.*, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 4cm (GOMES *et al.*, 2004), retalho cutâneo dorsal, dividido em quatro retalhos, sendo dois de base cranial e dois de base caudal, medindo cada retalho 5 X 3cm (ATABEY *et al.*, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 4cm (CYMROT; PERCÁRIO; FERREIRA, 2004), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 9 X 2cm (SIMMAN; CRAFT; MCKINNEY, 2005), retalhos cutâneos dorsais, em número de dois, de bases caudais, medindo cada um 11 X 2cm (HOSNUTER *et al.*, 2005), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 4cm (ABLA *et al.*, 2005), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 4cm (CARVALHO *et al.*, 2005), retalho cutâneo dorsal, de base caudal, medindo 10 X 3cm (MAUAD-JUNIOR *et al.*, 2006), retalho cutâneo dorsal, de base caudal, medindo 10 X 3cm (AYDOGAN *et al.*, 2006), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 3cm (HART *et al.*, 2006), retalho cutâneo, de base cranial, medindo 10 X 4cm (LIEBANO; ABLA; FERREIRA, 2006), retalho cutâneo dorsal, bipediculado, medindo 8 X 2cm (BEHESHTIAN *et al.*, 2006), retalho cutâneo dorsal, de base cranial, medindo 10 X 4cm (PRADO *et al.*, 2006), retalho cutâneo dorsal, de base caudal, medindo 7 X 2cm (GRIBBE *et al.*, 2007), retalhos cutâneos epigástricos, em número de dois, de base caudal, medindo cada um 6 X 4cm (FREITAS *et al.*, 2002), retalho cutâneo epigástrico, de base caudal, medindo 8 X 8cm (KOMOROWSKA-TIMEK *et al.*, 2004), retalho cutâneo ventral, de base caudal, medindo 8 X 4cm (BITTENCOURT *et al.*, 2005), retalho cutâneo ventral, de base caudal, medindo 6 X 3cm (YOSHIDA; DE CAMPOS, 2005), retalho cutâneo epigástrico, de base caudal, medindo 6 X 3cm (COSKUNFIRAT; OZKAN; DIKICI, 2006), retalho cutâneo epigástrico, de base caudal, medindo 8 X 8cm (MEIRER *et al.*, 2007), retalho cutâneo epigástrico, modelo de Finseth e Cutting, medindo 7 X 7cm (ERSOY *et al.*, 2007).

A restauração do fluxo sangüíneo, após um período de isquemia, é necessária para a recuperação da função celular normal; por outro lado, a reintrodução do sangue oxigenado nos tecidos isquêmicos pode desencadear lesões teciduais ainda mais intensas do que as provocadas pela isquemia “per se”. Esse agravamento das lesões teciduais foi chamado de “paradoxo do oxigênio”. McCord propôs que o mecanismo responsável por esse agravamento seria a geração de radicais livres de oxigênio conseqüentes à reintrodução de oxigênio molecular.

Sabe-se que radicais livres são gerados na isquemia e reperfusão (FRANCISCO NETO *et al.*, 2005).

A lesão por reperfusão foi descrita, inicialmente, por Cerra *et al.* (1975). O fenômeno “*no-reflow*” está bem documentado na literatura pesquisada e consiste em lesão vascular progressiva durante o processo de reperfusão, associada à uma zona de expansão com fluxo sanguíneo diminuído. May *et al.* (1978) descreveram esse processo a partir de um retalho livre experimental, concluindo que o fenômeno *no-reflow* seria causado por edema celular, agregação intravascular e vazamento de líquido intravascular para o espaço intersticial (KHALIL; AZIZ; HALL, 2006). A Inflamação e a regeneração de tecidos seguindo a reperfusão atraem células do sistema imune, especialmente, leucócitos polimorfonucleares, contribuindo, também, para a produção de espécies reativas de oxigênio. A seqüência e a extensão desses processos no início da reperfusão desempenham um papel determinante aos órgãos e funções celulares (HAMAR *et al.*, 2003).

A tolerância dos tecidos à agressão isquêmica depende do tipo de tecido e da idade celular. Na fase inicial da isquemia, o ATP é proveniente da glicólise. Entretanto, com certa brevidade, as reservas de glicogênio são depletadas, havendo acúmulo de lactato e outros produtos metabólicos tóxicos. Isso desencadeia a ativação de mediadores químicos e enzimas, as quais inclui a fosfolipase A2 e lisozimas. A fosfolipase A2 converte os fosfolípidios da membrana celular em ácido aracdônico, um precursor dos mediadores inflamatórios, como os leucotrienos e prostaglandinas. As lisozimas, por sua vez, são enzimas proteolíticas que atuam nos agentes patogênicos e células necróticas (KHALIL; AZIZ; HALL, 2006). Os metabólitos do ácido aracdônico, principalmente os leucotrienos aumentam a adesão dos leucócitos ao leito vascular, acentuando a permeabilidade vascular, uma característica da lesão por reperfusão. As células do endotélio vascular promovem um local de ancoragem para os leucócitos. A atuação dos leucócitos no endotélio envolve a adesão de moléculas, tais como, P-Selectin e L-Selectin e, moléculas de adesão intercelular. Os leucócitos liberam lisozimas, geram espécies reativas de oxigênio e liberam agentes quimiotáticos que recrutam mais leucócitos. Esses fatores são importantes porque animais com depleção de leucócitos apresentam uma lesão de reperfusão diminuída (KHALIL; AZIZ; HALL, 2006).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção

biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) ou Espécies Reativas do Nitrogênio (ERN). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS; DAVID, 2006). O organismo humano sofre ação constante de ERO e ERN geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou provenientes dos alimentos. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BARREIRO ;DAVID, 2006).

O radical $\text{HO}\cdot$ é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser seqüestrado *in vivo*. Estes radicais freqüentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio e por adição a insaturações (SILVEIRA, 2004; PYTEL *et al.*, 2005; BARREIROS; DAVID, 2006). O exemplo mais comum do ataque de radicais hidroxila a lipídios é a ação deste nos lipídios de membrana. Os radicais livres centrados no oxigênio ($\text{HO}\cdot$) atacam a cadeia lipídica em sítios susceptíveis como o grupo metilênicoalílico, convertendo-o em novo centro de radical livre. O carbono radicalar facilmente adiciona oxigênio gerando o radical lipídio-peroxila, que pode facilmente atacar as proteínas de membrana, produzindo danos nas células (BARREIROS; DAVID, 2006).

A forma mais deletéria do oxigênio ao organismo é o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), pois é a causa ou o intermediário da toxicidade fotoinduzida do O_2 em organismos vivos. O seu tempo de meia vida depende muito do meio onde se encontra. Em meio aquoso, sua meia-vida é muito pequena, pois ele se choca com as moléculas de H_2O transferindo sua energia, desativando-se e retornando à forma de oxigênio

triplete. Em meio orgânico é mais comum a ocorrência de choque com transferência de energia, sem reação química, seguida da dissipação dessa energia na forma de calor. Esse tipo de choque é denominado *quenching* colisional e representa a forma como a água desativa o 1O_2 . Porém, em meio orgânico, a meia-vida do oxigênio singleto é maior e, portanto, pode causar algumas reações químicas com determinados aceptores por incorporação do O_2 . O oxigênio singleto reage com algumas classes de biomoléculas e, em geral, essas reações são do tipo eno e dieno (reações de Diels-Alder). Os compostos naturais mais reativos frente ao 1O_2 são os carotenóides, devido as múltiplas insaturações conjugadas. Assim, o 1O_2 reage mais lentamente com os ácidos graxos que com o β -caroteno, e quanto maior o número de insaturações presentes nos ácidos graxos, mais rapidamente eles irão reagir (BARREIROS; DAVID, 2006).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical hidroxila. Ele somente oxida proteínas que apresentem resíduos de metionina ou grupos tiol muito reativos (BARREIROS; DAVID, 2006). O H_2O_2 é gerado in vivo pela dismutação do ânion-radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) por enzimas oxidases ou pela β -oxidação de ácidos graxos. As mitocôndrias são importantes fontes de $O_2^{\bullet -}$ e, como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, elas são ricas em SOD que o converte em H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio gerado é então parcialmente eliminado por catalases, glutathionaperoxidase e peroxidases ligadas à tioredoxina, mas como essa eliminação tem baixa eficiência, grande parte do H_2O_2 é liberado para a célula.

A atuação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) como oxidante direto é irrelevante. Dentre os aminoácidos, o único que sofre oxidação com o radical $O_2^{\bullet -}$ é a cisteína. A partir dessa reação forma-se um superóxido e o tio-radical. Além disso, o radical ânion superóxido $O_2^{\bullet -}$ presente no organismo é eliminado pela enzima superóxido dismutase, que catalisa a dismutação de duas moléculas de $O_2^{\bullet -}$ em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Este último, quando não eliminado do organismo pelas enzimas peroxidases e catalase, pode gerar radicais hidroxila. Apesar destes efeitos danosos, o radical $O_2^{\bullet -}$ tem importância vital para as células de defesa e sem ele o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos.

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. Assim como na formação das ERO, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Sabe-se que a região distal dos retalhos cutâneos randomizados constitui um estado de isquemia incompleta, com lesão dos tecidos ocasionada por radicais livres derivados do oxigênio. Um aporte sanguíneo adequado é fundamental para a sobrevivência desses retalhos e fatores como, lesão da vascularização, retalhos mal-desenhados e isquemia-reperfusão, podem levar a necrose parcial ou completa dos mesmos. Uma infiltração sobremaneira significativa dos neutrófilos no músculo esquelético e retalhos de pele já foi demonstrada em modelos animais de experimentação. Muitas tentativas foram realizadas, com o intuito de melhorar a sobrevivência dos retalhos de pele, após lesão por isquemia-reperfusão, utilizando para isso, substâncias que diminuem ou inibem a formação de radicais livres ou danos mediados por neutrófilos (HUEMER *et al.*, 2003; HART *et al.*, 2006).

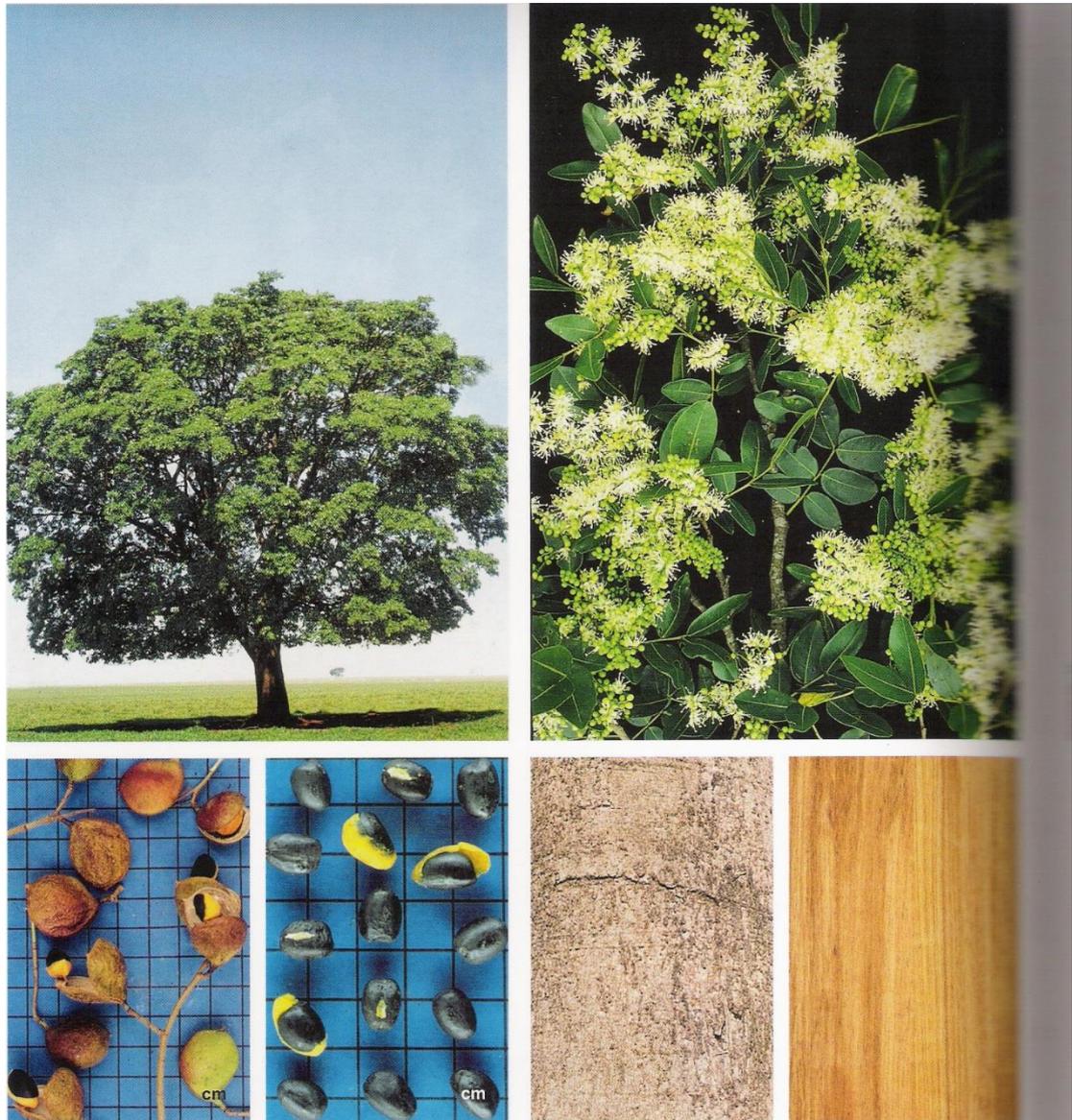
Todavia, vários agentes farmacológicos foram investigados, no que diz respeito a sua eficácia em prevenir ou reverter a isquemia em retalhos de pele. Simpatolíticos, vasodilatadores, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores de prostaglandinas, glicocorticóides, anticoagulantes e varredores de radicais livres constam entre as drogas que apresentaram melhora na sobrevivência dos retalhos cutâneos (HUEMER *et al.*, 2003). Essas substâncias são a superóxido dismutase exógena (SOD), catalase, alopurinol, vitaminas A,C e E, dexametazona, ciclosporina A, metilprednisolona, azatioprina, heparina, deferoxamina, L-arginina (KOMOROWSKA-TIMEK, 2004), anticorpo monoclonal para molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e cromolin sódico (AYDOGAN *et al.*, 2006), fator de crescimento do endotélio vascular, lidocaína e prilocaína tópicos (EMLA), carnitina, ácido oléico tópico e óxido nítrico (HART *et al.*, 2006), ginkgobiloba (SOUZA FILHO

et al., 2002), aspirina (GHAVAMI; NUTT; HARDY, 2002), nonivamida e nicoboxil (HUEMER *et al.*; 2003), lidocaína e epinefrina (ATABEY *et al.*, 2004), propofol (TYNER *et al.*, 2004), sildenafil (SARIFAKIOGLU *et al.*, 2004; HART *et al.*, 2006), dimetil-sulfóxido (ALMEIDA *et al.*; 2004), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (ESTEVES-JUNIOR; FERREIRA; LIEBANO, 2004), terazosina e propranolol (FONSECA *et al.*, 2004), minoxidil (BITTENCOURT *et al.*, 2005), manitol e vitamina C (YOSHIDA; DE CAMPOS, 2005), hidralazina (ESTEVES-JUNIOR *et al.*, 2005), acetilcisteína (ABLA *et al.*, 2005), ácido caféico (AYDOGAN *et al.*, 2006), clopidogrel (ERSOY *et al.*, 2007), óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf) (Silva *et al.*, 2009).

A *Copaifera langsdorffii* Desf. (*Leguminosae*) é popularmente denominada copaíba, sendo uma árvore grande que cresce abundantemente no Amazonas, Pará e Ceará, estados do Brasil. Seu óleo-resina (bálsamo de copaíba) é obtido de pequenos cortes da casca do caule da referida planta e utilizado de uma forma popular, para tratamento de várias afecções, dentre as quais, doenças da garganta, dos tratos urinário e pulmonar, úlceras e feridas cutâneas (PAIVA *et al.*, 2004a, 2004b).

A copaíba tem-se destacado entre as plantas medicinais mais utilizadas pela população amazônica. Trata-se de uma árvore de grande porte da família *Caesalpinacea*, chegando até 30 a 40m de altura. O óleo extraído do seu tronco é constituído, principalmente, por ácido copaífero e cariophileno, além de outros sesquiterpenos (ARAÚJO JÚNIOR *et al.*, 2005).

Figura 1 – *Copaifera langsdorffii* Desf



Fonte: Lorenzi (2002)

O óleo de copaíba tem assumido grande importância dentre estas substâncias não só na Região Amazônica como também em outros países para os quais é exportado. Tem sido utilizado por alguns como antiblenorrágico, anticatarral, antiinflamatório e cicatrizante. Por via vaginal é aplicado sob a forma de óvulos para o tratamento de cervicites e leucorréia. A espécie *Copaifera reticulata* Ducke é a mais importante do ponto de vista comercial, uma vez que desta é extraído 70% de todo o óleo comercializado no Brasil. (BRITO *et al.*, 2000). Segundo Lawrence, as espécies botânicas mais freqüentemente utilizadas na produção de óleo são: *C.*

reticulata (70%), *C. guianensis* (10%), *C. multijuga* (5%) e *C. officinalis* (5%). (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2007).

Estudos fitoquímicos mostraram a presença de óleos essenciais em torno de 08% (B-cariofileno; óxido de cariofileno; B-elameno; alfa-cis-bergamoteno; ar-curcumeno e alfa-trans-bergamoteno) e uma mistura de diterpenos em torno de 70% (ácidos caurenóico e poliáltico) (PAIVA *et al.*, 2004a, 2004b; SILVA *et al.* 2009).

No entanto, o ácido caurenóico é um dos vários diterpenos encontrado no óleo de copaíba. O Ácido caurenóico (ent-kaur-16-en-19-óico) foi descrito pela primeira vez em 1971 por Ferrari *et al.* No entanto, este ácido foi detectado apenas em oleorresinas de copaíba em 1998 por Braga *et al.* que isolou-o de *C. cearensis* usando cromatografia de troca iônica. Embora este diterpeno está presente em cerca de 30% de oleorresinas de copaíba que, por vezes, pode não ser detectado por GC porque o seu tempo de retenção é semelhante ao do ácido copálico, resultando na co-eluição. Entretanto, algumas vezes não é possível distinguir o ácido caurenóico (ou o copálico)].

Não obstante, diversos estudos têm demonstrado o amplo espectro de atividades biológicas do ácido caurenóico, como por exemplo: atividade antibacterina (VELIKOVA *et al.*, 2000); atividade anticonvulsivante (OKOYE *et al.*, 2013); atividades anti-inflamatória, antioxidante e antiliperoxidativa (PAIVA *et al.*, 2003); atividades analgésicas e anti-inflamatórias do ác. Caurenóico (CHAVAN *et al.*, 2012); atividade leishmanicida (SANTOS *et al.*, 2013); atividade moluscicida e cercaricida (*Schistosoma mansoni*) (MEDINA *et al.*, 2009); atividades antiparasitárias e antimicrobiana, *in vitro* (BOAKYE-YIADOM *et al.*, 1977; DAVINO *et al.*, 1989; BATISTA *et al.*, 1999; DE MELO *et al.*, 2001; WILKENS *et al.*, 2002; COTORAS *et al.*, 2004)

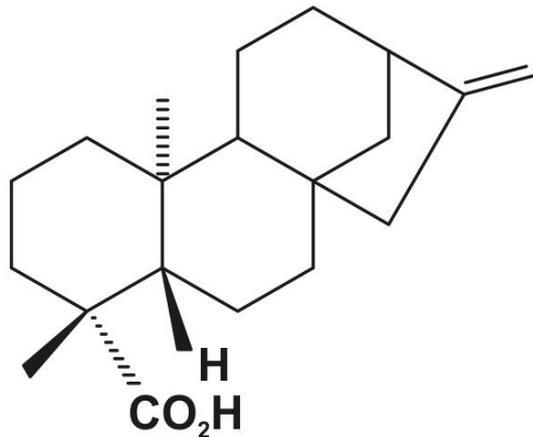
Todavia, Vários estudos farmacológicos foram realizados com ácido kaurane para determinar atividades relaxantes da musculatura uterina, anti-inflamatórias, bactericida e, efeitos citotóxicos, atividade contra tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, indução de genotoxicidade e efeitos vasodilatadores. (LEANDRO *et al.*, 2012)

Entretanto, o efeito relaxante da musculatura uterina conferido pelo ácido caurenóico foi reportado por Cunha *et al.*, (2003) De acordo com estes autores o ácido caurenóico exerce esse efeito relaxante, principalmente, através do bloqueio do cálcio e, em parte, abrindo os canais de potássio ATP-sensitivo. De acordo com

Cavalcanti *et al.*, (2006) o ácido caurenóico tem atividade prejudicial ao DNA em cultura de fibroblastos de hamster chineses, sob condições de ensaios cometa. Costa-Lotufo *et al.* (2002) indicaram o potencial citotóxico do ácido caurenóico através da destruição de embriões de ouriço do mar, da inibição do crescimento de células tumorais e da hemólise de eritrócitos humanos e de ratos. Atividade anti-inflamatória do ácido caurenóico foi reportada por Paiva *et al.* (2004) que isolou este ácido do oleorresina de *C. langsdorffii* Desf., tendo observado que o ácido caurenóico preveniu a lesão tecidual em colite induzida por ácido acético em modelo em rato, um efeito observado por outros autores, através de trocas bioquímicas, histológicas e macroscópicas, Foi observado, também, que o ácido caurenóico proveniente do oleorresina da *C. paupera* apresentou atividade antibacteriana contra *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. (LEANDRO *et al.*, 2012). No entanto, quando testado em esperma humano, o ácido caurenóico diminuiu a motilidade dos espermatozoides, sendo, apenas, fracamente espermicida (VALENCIA *et al.*, 1986).

Contudo, plantas que pertencem aos gêneros *Copaifera*, *Annona*, *Mykania* e *Xylopia* spp. são ricas em ácido caurenóico; no entanto, o ácido caurenóico utilizado nesse trabalho é proveniente da *Copaifera langsdorffii* Desf. (CAVALCANTI *et al.*, 2006).

Figura 2. Estrutura química do ácido caurenóico



Fonte: Costa-Lotufo et al., 2002

A L-arginina, ácido (L) 2-amino-5-guanidinovalérico, é um sólido branco e cristalino, praticamente inodoro, de alto ponto de fusão, devido aos dois grupos polares, solúvel em água e sensível à luz (WU *et al.*, 2000) É um aminoácido classificado como semiessencial, podendo ser sintetizado a partir da alimentação ou produzido endogenamente (WIESINGER , 2001). A arginina está presente em várias fontes alimentares, como as sementes (girassol e abóbora) e castanhas (amêndoas, nozes, amendoim e coco), a granola, o germe de trigo, os derivados do leite (queijo, ricota e iogurte), as carnes (boi, aves, peixe e porco), frutos do mar e a soja. (WELLS; EVERETT,2005; PADDON-JONES; BORSHEIM; WOLFE, 2004). A L-arginina é um aminoácido chave quando se consideram as interações metabólicas entre diferentes tipos de células. No fígado, quando reconvertida em ornitina pela ação da arginase, desempenha um papel importante no ciclo da uréia, removendo o excesso de amônia do organismo, ou serve, ainda, como precursora na formação de poliaminas. No interior dos macrófagos e outras células imunológicas, a L-Arginina é utilizada na formação de elementos como interleucinas, interferon e outros que, atuam no sistema de defesa de várias doenças, incluindo as de origem

cancerígenas (NOVAES; BEAL, 2004). A L-arginina é, também, um dos aminoácidos importantes na síntese de creatina, um substrato essencial no metabolismo energético do músculo, dos nervos e testículos (DURANTE; JOHNSON; JOHNSON, 2007; WIESINGER , 2001). Outra função importante da L-arginina está relacionada com a síntese de óxido nítrico, molécula gasosa que, entre outras atividades, desempenha ação direta no músculo liso vascular, promovendo a vasodilatação (WIESINGER , 2001; MARLETTA, 1993)

A L-arginina é um aminoácido essencial para ratos em crescimento, e embora possa ser sintetizada pelo organismo do animal não será suficiente para suprir a demanda do crescimento normal (VANNUCCHI; IGLESIAS; JORDÃO, 1998). A L-arginina possui numerosos e peculiares efeitos farmacológicos como o estímulo na liberação do hormônio de crescimento e indução da liberação de insulina e IGF-1 (Fator de Crescimento Insulina Símile). Este fator de crescimento está presente no fígado, plasma e fibroblastos e estimula a síntese de proteoglicanos sulfatados, colágeno e a proliferação de fibroblastos (BARBUL, 1990; FAINTUCH, 1995; COHEN , 1999). Estimula, também, a liberação da prolactina, e glucagon. Após o trauma, a L-arginina ajuda a manter funcionando o sistema imune mediado pelas células T, ou anula eficientemente a supressão imune associada com a injúria. Tem também efeito benéfico no catabolismo protéico pós-injúria (BARBUL , 1990). Em roedores e pacientes que foram traumatizados por cirurgias, a L-arginina aumenta a retenção de nitrogênio através da redução de sua perda pela urina (ELSAIR, 1978; BARBUL, 1981). Assim a suplementação de L-arginina na dieta reduz o catabolismo protéico e aumenta a resposta imune dos ratos após o trauma (KIRK ; BARBUL, 1990). A suplementação de L-arginina aumenta o peso do timo através do aumento do número de linfócitos e a resposta dos mesmos, a estimulação mitogênica. Nos ratos, em sepse, a suplementação também aumenta a síntese hepática de histonas e a síntese de proteínas de fase aguda (LEON ,1991). Seifter *et al.* 1978, demonstraram que suplementos de L-arginina preveniam a perda de peso durante o período pós-operatório em ratos submetidos a procedimento cirúrgico. Além disso, eles demonstraram que um suplemento de 1% de arginina aumentava a força tênsil do tecido lesado e a deposição de colágeno reparativo. Anos mais tarde, foi demonstrado, em humanos sadios voluntários, que doses farmacológicas de L-arginina aumentam significativamente a quantidade de hidroxiprolina. (BARBUL,

1990). A hidroxiprolina está presente quase que exclusivamente no colágeno, indicando que a L-arginina aumenta a síntese de colágeno reparativo.

No entanto, a arginina é um aminoácido não essencial processado metabolicamente pelo ciclo da uréia e envolvida em múltiplos distúrbios metabólicos e processos biológicos, incluindo liberação de vários hormônios, resposta imune, a regulação da inflamação, a síntese de colágeno durante a cicatrização de feridas, e biologia do tumor. A L-arginina é o precursor para a formação de óxido nítrico (NO), uma molécula de sinalização importante envolvida na neurotransmissão. Além disso, a arginina é um substrato metabólico essencial para as células do sistema imunológico e exigida para a função normal do linfócito. Arginina e NO são críticos para a fisiologia normal do trato gastrointestinal. Vários estudos têm sugerido que a formação endógena de óxido nítrico mantém a integridade da mucosa do intestino e protege o mesmo a partir de lesões de toxinas transmitidas pelo sangue e tecidos mediadores destruidores. Em um estudo recente, demonstrou-se que a arginina por via oral diminui a lesão intestinal causada por endotoxemia devido a um lipopolissacarídeo em um rato. Em outro estudo, foi demonstrado que a administração oral de arginina melhora a recuperação da mucosa intestinal seguindo a lesão de isquemia / reperfusão em ratos. Em uma revisão recente, foi descrito que a administração perioperatória de dietas suplementadas com arginina, em pacientes cirúrgicos eletivos resulta em uma redução substancial em complicações infecciosas e menor tempo de permanência hospitalar, sem nenhum efeito global na mortalidade em comparação com o tratamento padrão. (KOPPELMANN et al., 2012).

Todavia, a L-arginina, foi identificada pela primeira vez em extratos de mudas tremoço estiolados por Schultz e Steiger em 1886. A L-arginina é um aminoácido sintetizado a partir de glutamina, glutamato e prolina através do eixo intestinal-renal em seres humanos e na maioria de outros mamíferos, incluindo suínos, ovinos e ratazanas. Há provas convincentes de que a L-arginina regula o metabolismo de substratos de energia interórgãos, e que a suplementação através da dieta ou administração intravenosa de L-arginina melhora as respostas cardiovasculares, a vasodilatação insulina-dependente; bem como, o perfil metabólico. Os grandes efeitos sobre o último parece ser particularmente relevante em indivíduos em risco de desenvolver diabetes do tipo 2, devido aos efeitos benéficos sobre a

sensibilidade à insulina e sobre a disfunção endotelial, pois é sabido que a resistência à insulina no sistema vascular poderia preceder o desenvolvimento do metabolismo da glicose, alteração e resistência à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo. Tem sido mostrado recentemente que a longo prazo, por via oral, a administração de L-arginina melhora a sensibilidade à insulina, metabolismo da glicose e a função endotelial em pacientes diabéticos tipo 2 e em indivíduos cardiopatas com tolerância à glicose diminuída. (MONTI et al., 2012)

Também, há ampla evidência de que os aminoácidos individuais utilizados em doses farmacológicas podem modificar o metabolismo e modular a função imune durante a sepse (NEILLY et al., 1994). Destes, a arginina tem mostrado aumentar a função imune sistêmica. Embora, possa ser sintetizado endogenamente em muitos mamíferos, incluindo os seres humanos (RATNER, 1973), através do ciclo de Krebs, mais do que é obtido a partir da dieta. No entanto, após uma grande cirurgia, trauma e sepse, a homeostasia normal do aminoácido intra e extracelular é perturbada, com a consequente diminuição das respostas metabólicas e fisiológicas para que a suplementação de arginina possa ser necessária (NEILLY et al., 1994). (RISHI et al., 2011)

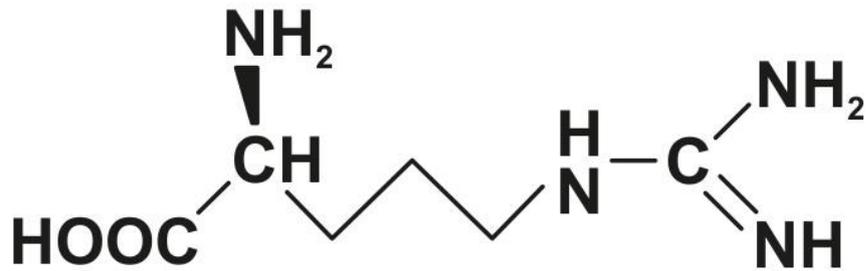
No entanto, a L-arginina é um aminoácido que serve como um substrato para a produção de óxido nítrico e foi demonstrado produzir vasodilatação endotélio-dependente sustentado em pacientes e, de induzir angiogênese em experimento com animais. A administração de L-arginina melhora a tolerância ao exercício em pacientes sintomáticos com doença vascular periférica, e pode ser benéfica em pacientes em condições caracterizadas por função endotelial alterada tais como doença arterial coronariana, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, hemocistinúria e diabetes. (KOKOROWSKA-TIMEK et al., 2004)

Não obstante, o óxido nítrico (NO) é um radical fraco produzido a partir da L-arginina via isoformas da óxido nítrico sintase (NOS), a NOS constitutiva neuronal (tipo 1, nNOS), NOS induzível (tipo 2, iNOS) e a NOS endotelial (tipo 3, eNos). Existem muitas funções importantes de NO no corpo humano, por exemplo, a concentração inadequada de óxido nítrico leva a vasoconstrição dos vasos intestinais, que pode levar à isquemia e uma predisposição à enterocolite necrotizante; o óxido nítrico atua como neurotransmissor para neurônios entéricos não adrenérgicos não colinérgicos e a inadequação de óxido nítrico pode alterar a motilidade intestinal. O óxido nítrico inibe as ações de leucócitos e altera as

respostas inflamatórias nos intestinos. Portanto, a concentração normal de óxido nítrico no trato gastrointestinal é muito importante. A L- arginina é um aminoácido catiônico semiessencial, a qual é utilizada como substrato na síntese de óxido nítrico e citrulina, através da oxidação da L- arginina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). Comparadas com crianças a termo amamentadas, as crianças pré-termo tem baixos níveis de arginina. A suplementação de arginina pode ajudar na prevenção de enterocolite necrotizante, promovendo a síntese de óxido nítrico. (ÇEKMEZ *et al.*, 2012). O óxido nítrico exerce ação pleiotrópica no organismo, sendo importante no controle da agregação plaquetária, resistência e crescimento vascular, no ritmo de filtração glomerular e processos inflamatórios, dentre outros. Nas células endoteliais, a L-arginina, que é um aminoácido essencial e sofre a ação de uma enzima produzida no endotélio, a óxido nítrico sintase (eNOS). Uma vez que a L-arginina é o substrato para a produção do óxido nítrico, estudos têm testado a hipótese de que a suplementação deste aminoácido poderia melhorar a função endotelial. Vários destes estudos têm associado à suplementação de L-arginina com redução da pressão arterial. Além disso, outros benefícios, como melhoria do fluxo sanguíneo e redução da agregação plaquetária, têm sido atribuídos à suplementação de L-arginina em modelos animais e humanos. (LIMA *et al.*, 2012)

Por conseguinte, a L-arginina é classificada como um semi-essencial ou condicionalmente aminoácido essencial com inúmeros papéis no metabolismo celular. Ela serve como um intermediário na solução de Krebs-Henseleit, do ciclo da ureia e como precursor para a biossíntese de proteínas, o óxido nítrico, creatina, poliaminas e L-glutamate. Em algumas condições de estresse que põe uma maior demanda sobre o corpo para a síntese de L-arginina, a mesma torna-se essencial, e, em seguida, é muito importante para assegurar a ingestão adequada de aminoácido para satisfazer o aumento de demandas fisiológicas criadas por estas situações. Condições em que a arginina torna-se necessária inclui períodos de crescimento e após a recuperação de lesões. A arginina, também, promove a cicatrização de feridas. Além disso, a arginina tem vários efeitos imunomoduladores. (EL-SHEIKH; KHALIL, 2011)

Figura 3 – Estrutura química da L-arginina



Fonte: Tsikas, 2005

Não obstante, o excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da Glutathione Peroxidase (GPx), Catalase (CAT) e Sulfóxido Dismutase (SOD2) ou, não enzimaticamente a exemplo de Glutathione (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e CoQH₂. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (BARREIROS, DAVID, 2006).

A glutathione reduzida (GSH) pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta. Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão; atua como transportadora e reservatório da

cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Ainda, é requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Diante do que foi abordado, a necrose dos retalhos de pele, ainda, constitui um desafio ao cirurgião plástico, na tentativa de reparar determinadas lesões decorrentes da perda cutânea. Muitas pesquisas foram feitas, utilizando algumas substâncias, com o intuito de atenuar os efeitos do estresse oxidativo, decorrente do fenômeno de isquemia-reperfusão. Assim, os antioxidantes podem funcionar como um adjuvante terapêutico para os retalhos cutâneos.

Assim sendo, não foram encontrados na literatura pesquisada, achados avaliando o ácido caurenóico na isquemia-reperfusão dos retalhos cutâneos randomizados em dorso de ratos, conferindo ineditismo e relevância a esse estudo.

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do ácido caurenóico e da L-arginina sobre o estresse oxidativo que ocorre na confecção dos retalhos cutâneos randomizados, em ratos.

3 MÉTODO

O projeto de pesquisa foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA, da Universidade Federal do Ceará, em 30 de setembro de 2008, sob o número 64/08. Foram obedecidas as normas estabelecidas pelo *Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS)* e os preceitos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

Foram utilizados 54 ratos jovens (idade: 60 ± 5 dias), púberes, machos (*Rattus norvegicus* : var. *albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*), pesando de 170 a 285 g, peso médio 241,3 g, (Apêndice A), da linhagem WISTAR, saudáveis e bem nutridos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, criados e mantidos sob condições ambientais e alimentares semelhantes.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, providas de tampa com grade metálica de ácido inoxidável e forradas com maravalhas, alojadas em dependências refrigeradas ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Observou-se em alternância dos ciclos claro/escuro a cada 12 horas. Água potável e ração comercial para ratos (GuabiNutrilabor®, Mogiana alimentos, São Paulo) foram ofertadas *ad libitum* até 12 horas antes do experimento. A higienização das gaiolas e o exame dos animais foram realizados diariamente pelo técnico responsável e pelo pesquisador, respectivamente.

Os ratos foram, previamente, aclimatados por um período de 7 dias antes da realização do experimento. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em ambiente refrigerado, no Laboratório de Cirurgia Experimental do Centro Universitário Christus - Unichristus

Os 54 ratos foram distribuídos, ao acaso, em três grupo (n = 18)

Grupo Controle Salina (GC): Constituído por 18 ratos, tratados com solução salina e submetidos aos procedimentos cirúrgicos estabelecidos para todos os animais.

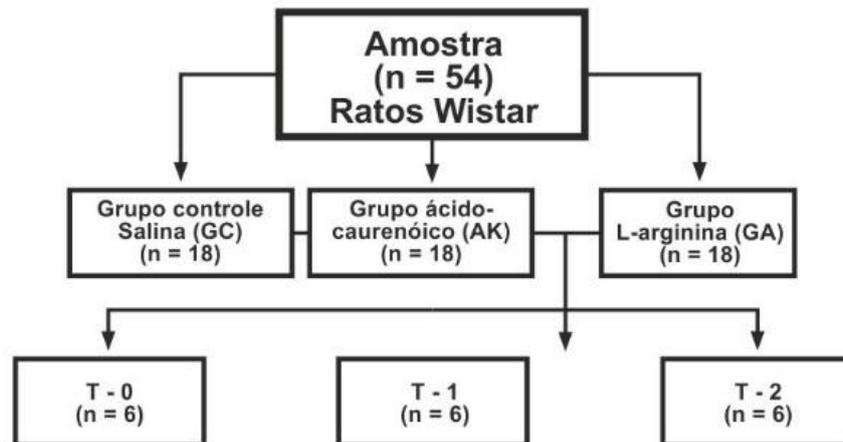
Grupo Ácido Caurenóico (AK): Constituído por 18 ratos, tratados com ácido caurenóico e submetidos aos procedimentos cirúrgicos estabelecidos para todos os animais.

Grupo L-Arginina (GA): Constituído por 18 ratos, tratados com L - arginina e, submetidos aos procedimentos cirúrgicos estabelecidos para todos os animais.

Os animais de cada grupo foram redistribuídos em três subgrupos, com 06 ratos cada, nomeados de acordo com o tempo de coleta do material para estudo e morte do animal. (T-0; T-1; T-2) Figura 4

Figura 4 - Distribuição dos grupos e subgrupos, denominados conforme o tipo de droga utilizada na pesquisa e o tempo de coleta das amostras e morte dos animais.

DISTRIBUIÇÃO DOS ANIMAIS



O Grupo Controle Salina (GC) foi tratado com solução salina a 0,9%, na dose de 5,0ml/kg de peso, sendo 01 dose pré-operatória 2 horas antes da confecção do retalho cutâneo e, após o ato cirúrgico, uma dose para o subgrupo T- 1 e seis doses para o T – 2, administradas diariamente, VO, por gavagem.

O Grupo Ácido Caurenóico foi administrado, por gavagem, na dose de 100mg/Kg de peso, em uma solução de DMSO a 3%, sendo uma dose pré-operatória 2 horas antes da confecção do retalho cutâneo e, após o ato cirúrgico, uma dose para o subgrupo T- 1 e seis doses para o T – 2.

O Grupo L- Arginina foi administrado, por via intraperitoneal, na dose de 05g/Kg de peso, diluída em água destilada, sendo uma dose pré-operatória 2 horas antes da confecção do retalho cutâneo e após o ato cirúrgico, uma dose para o subgrupo T- 1 e seis doses para o T – 2.

3.1 Desenho do Estudo (Figura 5)

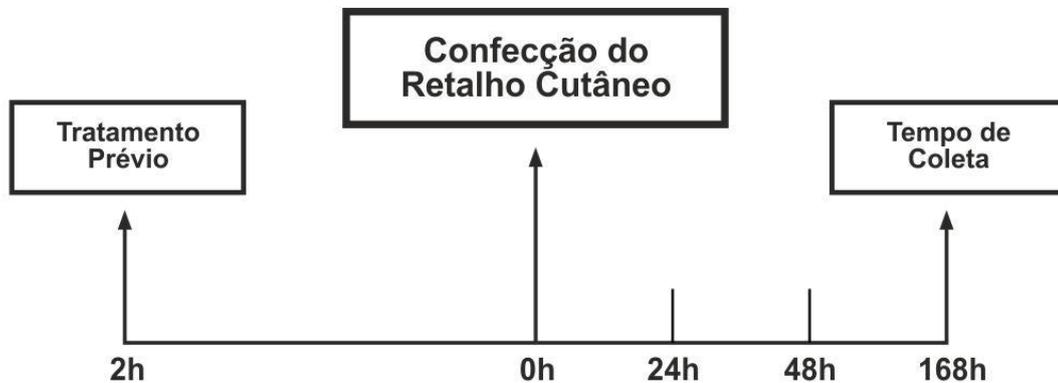


Figura 5 – Desenho do estudo – Pré e pós-tratamento com solução salina (SS), ácido caurenóico na dose de 100mg/Kg de peso e L-arginina na dose de 05g/Kg de peso; sendo o ácido caurenóico por via oral (gavagem) e, a L-arginina por via intraperitoneal – O tempo 0 corresponde ao ato operatório (confecção do retalho cutâneo) - As coletas foram realizadas com 24, 48 e 168 horas após a cirurgia e , finalmente, a morte dos animais.

O estudo foi realizado no mesmo horário do dia, em cada grupo experimental, para evitar-se a variação circadiana das respostas.

3.2 O Estudo

Os ratos de cada grupo foram pesados individualmente, ao início do experimento, para obtenção do cálculo dos volumes das diversas substâncias administradas durante o experimento. Tendo sido realizado o cálculo, obteve-se o volume das soluções a serem administradas, via oral, por gavagem e, intraperitoneal para cada animal. Os animais permaneceram em jejum, com oferta de água, a partir de 12 horas que antecederam o procedimento cirúrgico.

A técnica anestésica utilizada foi a combinação da ketamina (90mg/kg de peso corporal), associada à xilazina (10mg/kg de peso corporal), administrados por via intraperitoneal, mantendo um plano anestésico satisfatório à realização do procedimento cirúrgico. A profundidade anestésica foi avaliada por parâmetros clínicos, como as frequências cardíacas e respiratórias, movimentos das narinas ou outros grupos musculares, o que evidencia superficialização do plano anestésico.

Atingindo o plano anestésico satisfatório, o animal era submetido à epilação da região dorsal e colocado sobre uma prancha de madeira revestida por uma lâmina de plástico fenólico, com extensão das quatro patas e em decúbito ventral. Em seguida, era demarcado o retalho de pele, de forma retangular, medindo 8,0cm de comprimento por 2,5cm de largura, de base caudal, tendo como parâmetro anatômico, as cristas ilíacas. Esse retalho foi uma modificação da técnica descrita por McFarlane (1965) e utilizado por Sarifakioglu *et al.* (2004). A marcação do retalho foi realizada com tinta permanente®. Após a marcação do retalho, fez-se antissepsia com solução de polivinilpirrolidona-iodo, foram colocados campos cirúrgicos e em seguida, com bisturi de lâmina 15, a pele foi incisada e o retalho cutâneo foi elevado, incluindo o panículo carnoso, equivalente ao tecido subcutâneo em humano, e logo em seguida, reposicionado e suturado na área receptora que coincidiu com a área doadora do mesmo, com fio de nylon 5-0, pontos separados. Após o ato operatório, os animais foram recolocados nas respectivas gaiolas.

Durante o experimento, foram realizadas duas intervenções cirúrgicas em todos os grupos: A primeira que, consistiu na confecção dos retalhos cutâneos (elevação e reposicionamento na área receptora); a segunda que teve como objetivo, a coleta de material para análise laboratorial, efetuada de acordo com os tempos para coleta (T -0; T -1; T -2).

Para a coleta de material, o animal foi anestesiado, conforme descrição acima, em seguida, colocado sobre a prancha de madeira, revestida de plástico fenólico, em decúbito ventral, onde foi retirada a parte central do retalho de pele e congelada em nitrogênio líquido; sendo que, no retalho cutâneo, foram dosadas as concentrações de citocinas IL-1 β , TNF- α , Malondialdeído, Glutathione, Mieloperoxidase, Nitrito/Nitrato (Nox),. Essa coleta foi realizada com 24 horas, após a confecção dos retalhos de pele, para os subgrupos T – 0; com 48 horas para os subgrupos T – 1; e com 168 horas para os subgrupos T – 2. Após a coleta do tecido, os animais foram mortos por hipovolemia.

As figuras 6, 7,8,9 e 10 mostram o desenho do retalho, após a sutura e no 7º. dia de pós-operatório, onde foi identificada necrose da parte distal do mesmo.

Figura 6 – Demarcação do retalho cutâneo no dorso do rato 01 GC



Figura 7 – Retalho cutâneo suturado, no dorso do rato 02 do GC



Figura 8 – Retalho cutâneo no dorso do rato, no 7º. dia de pós-operatório, evidenciando necrose distal, do grupo controle salina (solução salina).



Figura 9 - Retalho cutâneo no dorso do rato, no 7º. dia de pós-operatório, evidenciando necrose distal, do grupo ácido caurenóico.



Figura 10 - Retalho cutâneo no dorso do rato, no 7º. dia de pós-operatório, evidenciando necrose distal, do grupo L - arginina.



.O fluxograma apresentado, abaixo, mostra as etapas cirúrgicas do experimento. (Figura 11)

Figura 11 - Fluxograma do experimento

DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO



3.2.1 Substâncias utilizadas

A solução salina (0,9%) utilizada no estudo foi produzida pela Química Farmacêutica Gaspar Viana (Fortaleza-Ce).

O ácido caurenóico foi extraído do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) pela Professora Nilce Viana Gramosa Pompeu de Sousa Brasil, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará.

L-arginina, (S)-2-Amino-5-guanidinopentanoic acid, fabricado pelo laboratório Sigma-Aldrich, USA.

3.2.2- Coleta do material para análises laboratoriais

Nos tempos T0, T1 e T2, e para cada grupo de estudo citados anteriormente, os animais serão anestesiados e submetidos à remoção do 1/3 médio do retalho cutâneo, medindo aproximadamente 10cm² de tecido. O fragmento de tecido, imediatamente depois de retirado será mergulhado em nitrogênio líquido a cerca de -190°C e transportado até o Departamento de Morfologia e armazenado no freezer -80°C para realização da dosagem de mieloperoxidase (MPO), malondialdeído (MDA), glutathiona reduzida (GSH) e Nitrito/Nitrato (Nox). A detecção das citocinas TNF- α , IL-1 β , em fragmentos de retalhos cutâneos do dorso dos animais estudados, serão determinadas por ELISA, usando o Kit DuoSet (R&D Systems).

3.2.3 Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) no retalho cutâneo de ratos.

Os níveis de malondialdeído no retalho cutâneo dos grupos de ratos citados anteriormente serão determinados pelo método de Uchiyama e Mihara (1978). Fragmentos do retalho cutâneo de ratos submetidos aos tratamentos citados anteriormente serão homogeneizados com KCl gelado 1.15% para obtenção de um homogenato à 10%. Meio mililitro (0,5ml) do homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrifuga de 10 ml, contendo 3 ml de H₃PO₄ (1%) e 1 ml de uma solução aquosa de ácido tiobarbitúrico aquoso (0,6%). Posteriormente, os tubos foram aquecidos, por um período de 45 minutos, em um banho de água fervendo e a mistura reacional foi, então, resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 4 ml de n-butanol. Após a adição de n-butanol, as amostras foram agitadas por 40 segundos em um misturador "vortex", e depois centrifugados a 1200 xg, por um período de 10 minutos. O sobrenadante foi mensurado a uma absorbância de 520 e 535 nm, em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmol/g de tecido cutâneo.

3.2.4 Determinação dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH) no retalho cutâneo de ratos.

A dosagem de GSH será realizada através de determinação dos grupos sulfidrílicos não protéicos (glutathiona), de acordo com a metodologia descrita por Sedlak; Lindsay (1968), das amostras de retalho cutâneo de ratos submetidos aos tratamentos anteriores citado. A determinação da GSH baseia-se na reação do DTNB, com o tiol livre originando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. Inicialmente, 50-100 mg do retalho cutâneo foi homogeneizado em EDTA 0,02 M (1 ml/100 g de tecido) gelado. A uma alíquota de 400 µl do homogenato foi adicionado 320 µl de água destilada, e 80 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 50%. Em seguida o material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, seguido de agitação e filtração. Depois de centrifugado, 400 µl do sobrenadantes foram misturados a 800 µl de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e, por fim, foi adicionado 20 µl de DTNB (5,5'-dithio-bis -2- ácido nitrobenzóico) a 0,01M. O material foi então agitado durante 3 minutos e a absorbância foi determinada a 412 nm, em espectrofotômetro. A concentração de GSH/g de tecido foi determinada a partir de uma curva padrão de glutathiona reduzida, processada de maneira semelhante. Os resultados foram expressos em µg de GSH/g de tecido.

3.2.5 Determinação da concentração de mieloperoxidase (MPO) no retalho cutâneo de ratos.

Mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos, entre eles o tecido cutâneo. Para tanto, 50mg do retalho cutâneo dos grupos de ratos citados anteriormente serão pesados e colocados em 1 ml de tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio, pH 6,0. Depois foram homogeneizados em um macerador Politron para obtenção do homogenato. A seguir, o homogenato foi centrifugado a 4500 rpm por 12 minutos a 4° C, e o sobrenadante foi colhido. A atividade da MPO por mg de tecido foi aferida através da técnica descrita por Bradley; Christensen; Rothstein (1982), utilizando peróxido de hidrogênio a 1% como substrato para a MPO. A unidade da atividade de MPO foi

definida como aquela capaz de converter 1 μmol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto. Durante o ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio é degradado ocorre a produção do ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dianosidine em um composto de cor marrom. Os resultados foram expressos como Unidade (U) de MPO/mg de tecido.

3.2.6 Dosagem de TNF- α , IL-1 β no retalho cutâneo de ratos.

Uma amostra do retalho cutâneo dos grupos de ratos citados anteriormente será utilizada para a determinação das citocinas presentes, através da dosagem de TNF- α , IL-1 β . O tecido coletado foi homogeneizado em tampão para citocinas como descrito por Safieh-Garabedian et al., (1995). A detecção das citocinas IL-1 β , TNF- α foram determinadas por ELISA, usando o Kit DuoSet (R&D Systems). Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 18h a 4°C com 100 μl por poço de anticorpo de captura para IL-1 β , TNF- α . Posteriormente, as placas foram lavadas, três vezes, com 300 μl de tampão de lavagem e bloqueadas com 100 μl , por poço, de BSA 1%. Após bloqueio das placas com BSA 1% por 1 hora, 100 μl das amostras já homogeneizadas e da citocina padrão para TNF- α , IL-1 β foram adicionadas, em duplicata, a cada poço e incubadas por 2 horas a 4 °C. As placas foram, então, lavadas três vezes com 300 μl de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-1 β , TNF- α ou . Após o período de incubação a 4 °C por 2 horas, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 300 μl de tampão de lavagem e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos com 100 μl de estreptavidina diluída de 1:200. As placas foram lavadas novamente por mais três vezes com 300 μl de tampão de lavagem e, depois, 100 μL da solução substrato para revelação (Kit DuoSet, R&D Systems Catalog – DY999) foi adicionado. As placas foram incubadas durante 20 minutos, no escuro à temperatura ambiente. A Reação enzimática foi parada com a solução de parada (H_2SO_4) e a absorbância medida à 450nm. Os resultados foram expressos em pg/mL.

3.2.7 Dosagem Nitrito/Nitrato no retalho cutâneo de ratos.

O reativo de Griess (N-1-naftiletilenodiamina a 0,1% em água bidestilada, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%) revela a presença de nitrito em uma amostra de homogenato tecidual (fragmento do dorso do animal) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo, com um pico de absorvância em 560 nm. Reagentes: Ácido Fosfórico 5% Sulfonilamide 1% NEED (N-1-naftiletilenodiamina) 0,1% - $C_{10}H_{14}N_2 \times 2HCl$ 75 5.1.3 Preparação do Reagente de Griess 1 volume de ác. fosfórico 5% 1 volume de sulfonilamida 1% em ac. fosfórico 5% 1 volume de NEED 0,1% 1 volume de água destilada. Curva Padrão: Solução estoque de $NaNO_2$ (10mM em tampão). Pesar 6,9mg e dissolver em 10mL de água destilada. Foram feitas diluições em série e usadas na obtenção da curva padrão (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,76 μM). Protocolo: Para realização do ensaio foram usados 100 μL do reagente de Griess e adicionados 100 μL do sobrenadante (amostras previamente centrifugadas) do homogenato a 10% dos segmentos retirados do dorso do animal. Para o branco foram usados 100 μL do reagente de Griess e adicionados 100 μL de salina. A leitura da absorvância foi feita em 540 nm em leitor de placa. As leituras da absorvância dos padrões (y) foram plotadas contra a concentração de cada padrão (x), então se determinou a equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de nitrito em cada amostra.

3.3 Análise estatística

Para todas as variáveis, realizou-se uma análise descritiva dos dados (Apêndice B) onde foram determinadas as curvas de normalidade, aplicando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Diferenças entre os grupos foram determinadas usando-a análise de variância (ANOVA) de um fator (unidirecional) seguida do teste de Dunnett. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Diferenças significativas foram indicadas por valores de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 PERDAS DE ANIMAIS

Não ocorreram óbitos ou outras complicações no período de observação, durante ou no intervalo dos procedimentos cirúrgicos.

4.2 PESOS DOS RATOS

Os pesos individuais dos ratos no início do experimento estão apresentados no Apêndice A (Tabela 1, Dados brutos). A Tabela 1 contém os valores (pesos médios) obtidos na pesagem dos animais de cada grupo. Não houve uniformidade entre os pesos médios dos grupos. O maior valor foi obtido (267,2) foi no GC, enquanto que o menor peso médio foi encontrado no GA (199,4).

Tabela 1 - Peso médio dos ratos utilizados no estudo

Grupos	n	Peso médio (X±DP) ^a
GC - Grupo controle	18	267,2±3,19
GK - Grupo ác. caurenico	18	249,7±3,34**
GA - Grupo L-arginina	18	199,4±4,53***

FONTE: O Autor (2014)

NOTA: n= número de ratos de cada grupo

^aX±DP = média ± desvio padrão

4.3 EFEITOS DA ISQUEMIA/REPERFUSÃO EM RETALHOS CUTÂNEOS RANDOMIZADOS

4.3.1 Efeitos sobre a expressão de IL-1 na pele dos ratos

O ácido caurenóico promoveu diminuição significativa da expressão de IL-1, decorridas 24h e 48h da construção do retalho cutâneo randomizado. Não ocorreram alterações significantes no grupo GA. (Tabela 2, Figuras 12-14).

Tabela 2 - Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre as concentrações de IL-1 na pele (pg/mg) de ratos sadios comparados ao respectivo controle (GC), decorridas 24h, 48 e 168 h da construção do retalho cutâneo randomizado

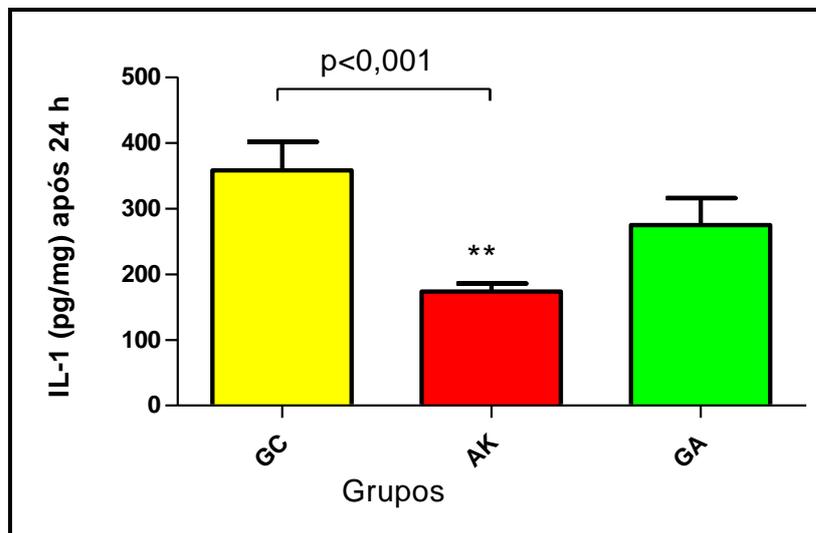
Grupos	Pontos temporais		
	24 h	48 h	168 h
GC	358,0±105,7	332,6±88,58	209,5±32,15
AK	173,5±30,53 **	169,1±55,94**	154,9±32,05
GA	274,81±01,1	239,9±73,32	214,0±62,31

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT

** $p < 0,001$ comparados ao controle (GC)

Figura 12 - Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre as concentrações de IL-1 na pele (pg/mg) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado

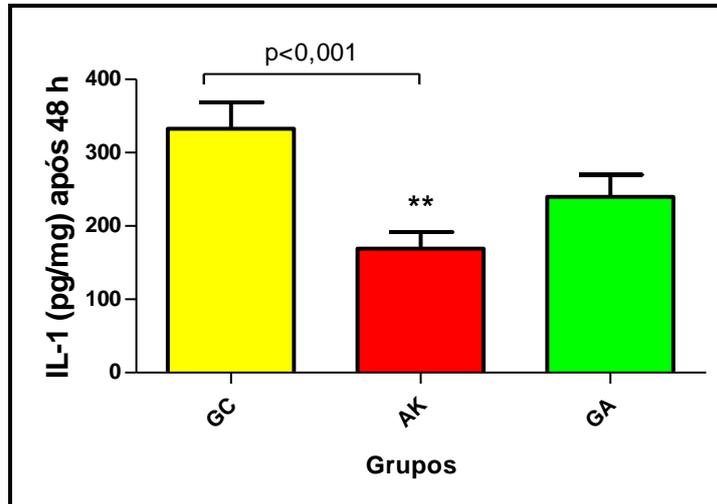


FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT

** $p < 0,001$ - comparado ao controle (GC)

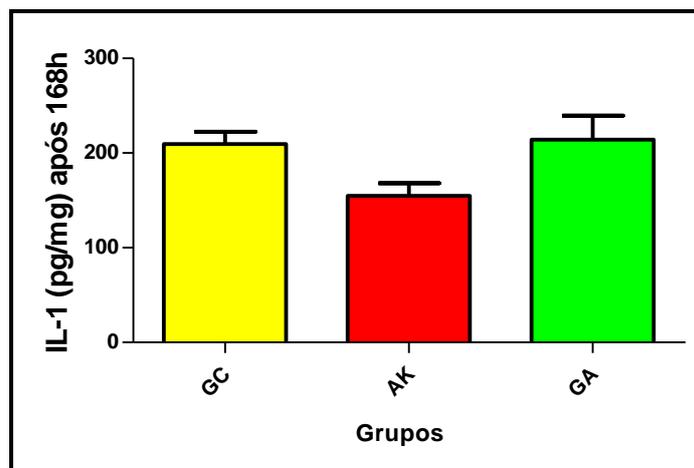
Figura 13 - Efeitos do ácido caurenico, da l-arginina sobre as concentrações de IL-1 na pele (pg/mg) de ratos saudios comparados ao controle (GC), decorridas 48h da construção do retalho cutâneo randomizado



FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT ** $p < 0,001$ - comparado ao controle (GC)

Figura 14 - Efeitos do ácido caurenico, da l-arginina sobre as concentrações de IL-1 na pele (pg/mg) de ratos saudios comparados ao controle (GC), decorridas 168h da construção do retalho cutâneo randomizado



FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT * $p < 0,05$ - comparado ao controle (G1)

4.3.2 Efeitos sobre a expressão de TNF α na pele dos ratos

O ácido caurenóico promoveu diminuição significativa da expressão de TNF α , decorridas 24h e 48h da construção do retalho cutâneo randomizado. Não ocorreram alterações significativas no grupo GA em nenhum dos pontos temporais estudados (Tabela 3, Figuras 15-17).

Tabela 3 - Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre as concentrações de TNF α na pele (pg/mL) de ratos saudáveis comparados ao controle (GC), decorridas 24h, 48 e 168 h da construção do retalho cutâneo randomizado

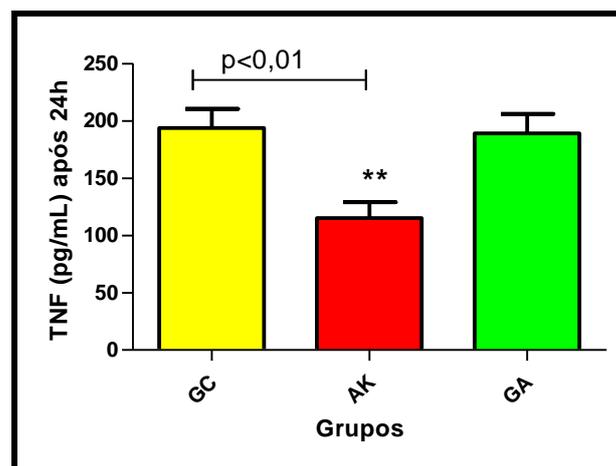
Grupos	Pontos temporais		
	24 h	48 h	168 h
GC	193,9 \pm 40,53	208,7 \pm 58,13	195,8 \pm 59,00
AK	115,1 \pm 33,94**	105,4 \pm 25,93**	177,2 \pm 34,10
GA	189,0 \pm 41,90	191,0 \pm 41,71	182,9 \pm 42,86

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT

* $p < 0,05$ - ** $p < 0,001$ comparados ao respectivo controle (GC)

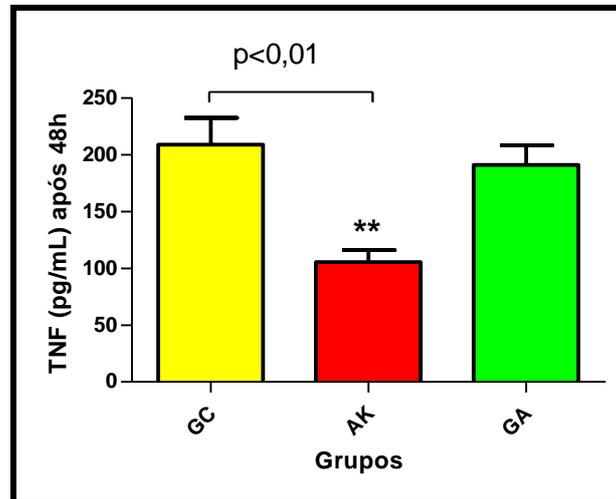
Figura 15 - Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre as concentrações de TNF α na pele (pg/mL) de ratos saudáveis comparados ao controle (GC), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado



FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT ** $p < 0,001$ - comparado ao controle (GC)

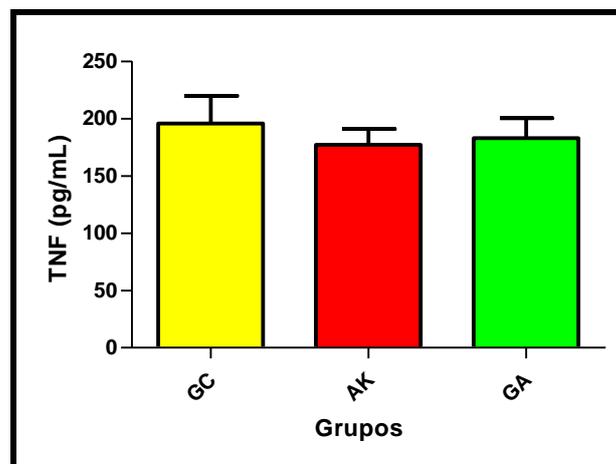
Figura 16 - Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre as concentrações de TNF α na pele (pg/mL) de ratos saudáveis comparados ao controle (GC), decorridas 48 h da construção do retalho cutâneo randomizado



FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT ** $p < 0,001$ - comparado ao controle (GC)

Figura 17 - Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre as concentrações de TNF α na pele (pg/mL) de ratos saudáveis comparados ao controle (GC), decorridas 168 h da construção do retalho cutâneo randomizado.



FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT. Diferenças não significantes $p > 0,05$

4.3.3 Efeitos sobre a concentração de MDA na pele dos ratos

O ácido caurenóico e a L-arginina promoveram diminuição significativa da concentração de MDA, decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado. Decorridas 48h do uso do ácido caurenóico houve redução da concentração de MDA (Tabela 4, Figuras 18-20).

TABELA 4 - Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre as concentrações de MDA na pele ($\mu\text{mol}/\text{tecido}$) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado

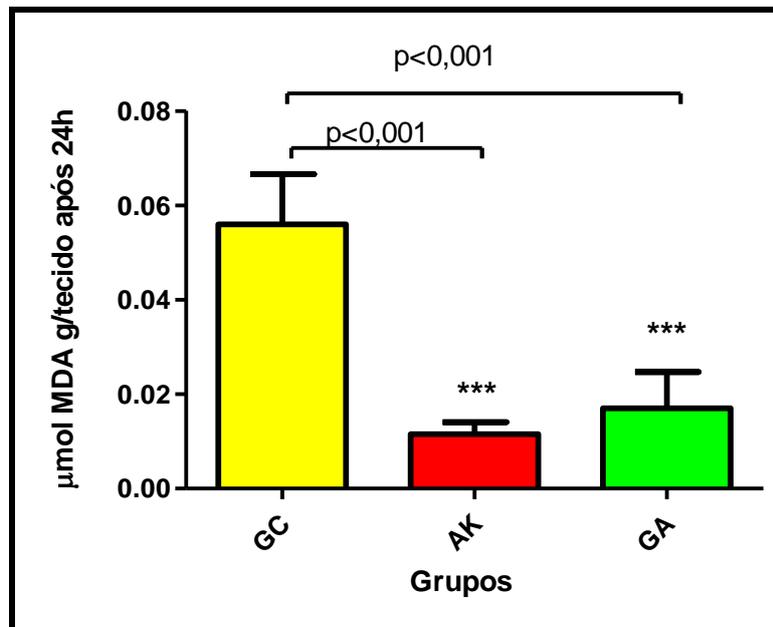
Grupos	Pontos temporais		
	24 h	48 h	168 h
GC	0,056 \pm 0,011	0,031 \pm 0,008	0,027 \pm 0,010
AK	0,011 \pm 0,003***	0,015 \pm 0,004**	0,031 \pm 0,013
GA	0,017 \pm 0,008***	0,027 \pm 0,011	0,044 \pm 0,010*

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT

* $p < 0,05$, - ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ - comparado ao respectivo controle (GC)

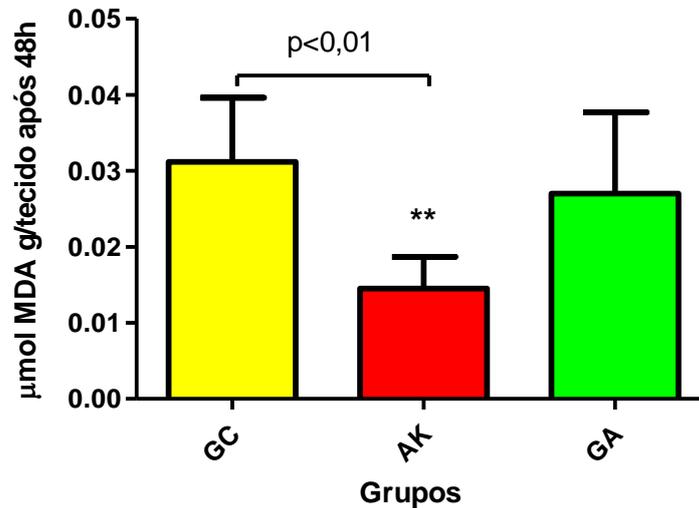
Figura 18 - Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre as concentrações de MDA na pele ($\mu\text{mol}/\text{tecido}$) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado



FONTE: O Autor (2014) **Nota:** Teste: ANOVA/ DUNNETT

** $p < 0,001$ - comparado ao respectivo controle (GC)

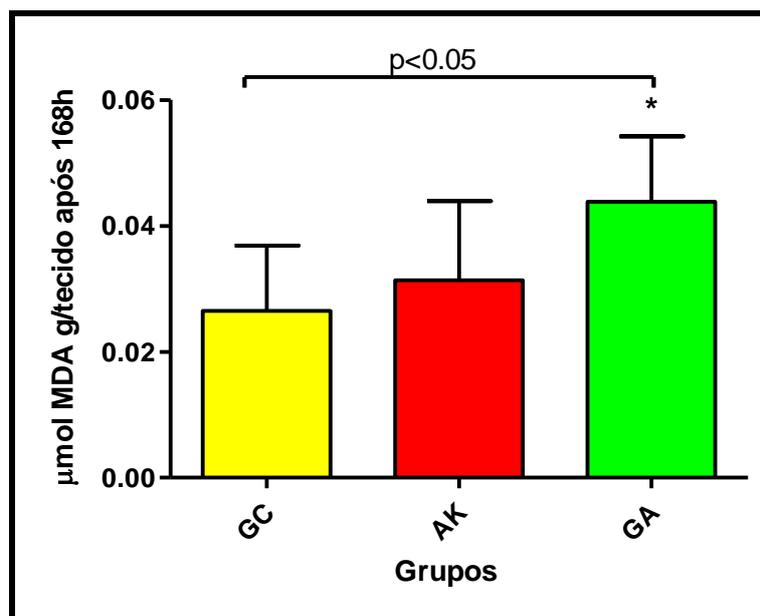
Figura 19 - Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre as concentrações de MDA na pele ($\mu\text{mol}/\text{tecido}$) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 48h da construção do retalho cutâneo randomizado



FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT ** $p < 0,001$ - comparado ao controle (GC)

Figura 20 - Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre as concentrações de MDA na pele ($\mu\text{mol}/\text{tecido}$) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 168h da construção do retalho cutâneo randomizado



FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT ** $p < 0,05$ - comparado ao controle (GC)

4.3.4 Efeitos sobre a concentração de tiois não protéicos -(NPSH) na pele dos ratos

O ácido caurenóico e a L-arginina promoveram aumento significativo da concentração de tiois não protéicos (NPSH), decorridas 24/48h da construção do retalho cutâneo randomizado. Decorridas 168h somente o ácido caurenóico induziu um aumento da concentração de NPSH. (Tabela 5, Figuras 21-23).

Tabela 5 - Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre as concentrações de tiois não proteicos (NPSH) na pele (nmol de NPSH/mg de proteína) de ratos saudáveis comparados ao controle (GC), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado

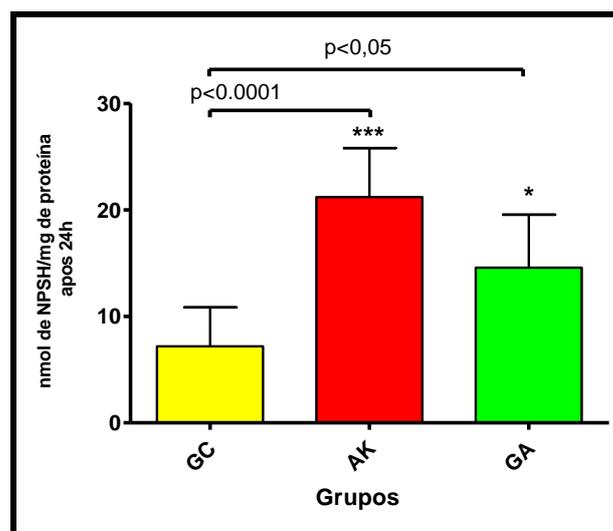
Grupos	Pontos temporais		
	24 h	48 h	168 h
GC	7,185±3,66	5,830±2,99	9,700±2,73
AK	21,220±4,59***	19,920±3,75***	15,300±5,61*
GA	14,570±4,98*	12,710±5,83*	6,670±1,64

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ TUKEY

* $p < 0,05$, - *** $p < 0,0001$ - comparados ao respectivo controle (GC)

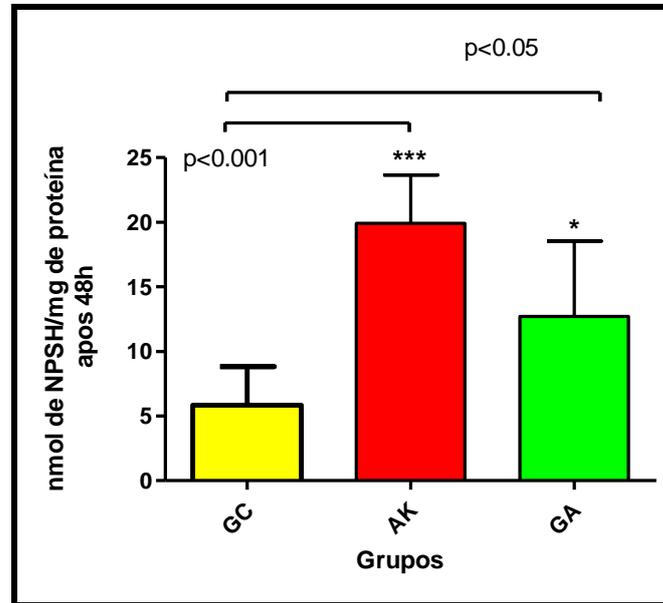
Figura 21 - Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre as concentrações de tiois não proteicos (NPSH) na pele (nmol de NPSH/mg de proteína) de ratos saudáveis comparados ao controle (GC), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado



FONTE: FONTE: O Autor (2014) Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT

* $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ - comparados ao respectivo controle (GC)

Figura 22 - Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre as concentrações de tiois não proteicos (NPSH) na pele (nmol de NPSH/mg de proteína) de ratos saudáveis comparados ao controle (GG), decorridas 48h da construção do retalho cutâneo randomizado

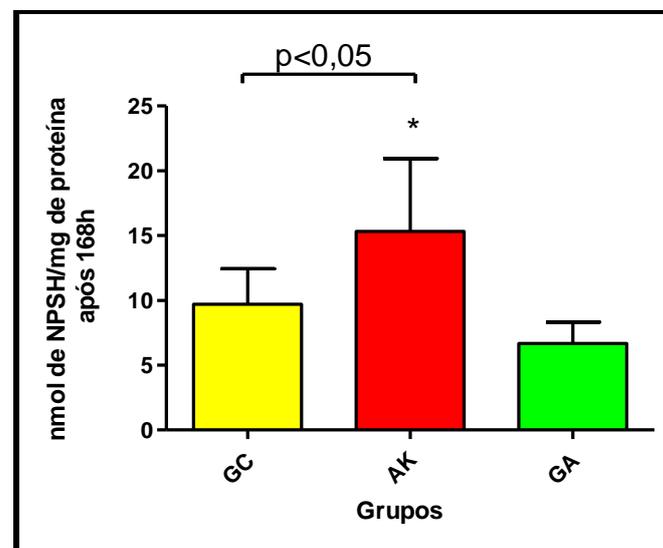


FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT

*** $p < 0,001$ - $p < 0,05$, comparados ao respectivo controle (GC)

Figura 23 - Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre as concentrações de tiois não proteicos (NPSH) na pele (nmol de NPSH/mg de proteína) de ratos saudáveis comparados ao controle (GG), decorridas 168h da construção do retalho cutâneo randomizado



FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT, $p > 0,05$, comparado ao respectivo controle (GC)

4.3.5 Efeitos sobre a atividade da MPO na pele dos ratos

O ácido caurenóico promoveu diminuição significativa da atividade de MPO, decorridas 24h/48h da construção do retalho cutâneo randomizado. Não foram observadas diferenças significantes após. 168h da construção do retalho cutâneo randomizado. (Tabela 6, Figuras 24-26).

TABELA 6- Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre a atividade da MPO na pele (U MPO/g tecido) de ratos saudáveis comparados ao controle (GC), decorridas 24h/48h/168h da construção do retalho cutâneo randomizado

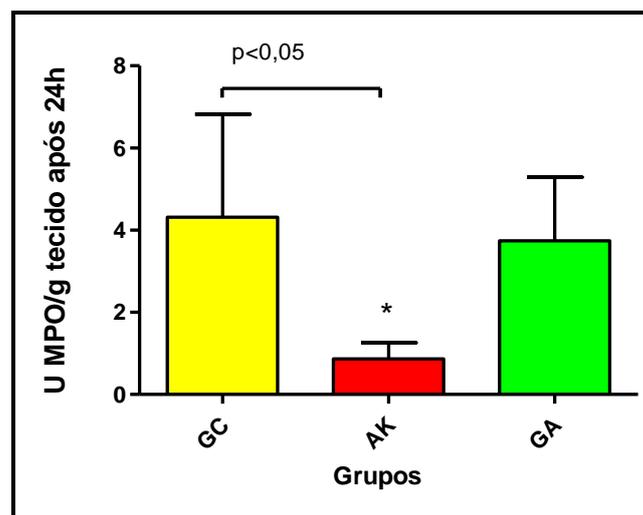
Grupos	Pontos temporais		
	24 h	48 h	168 h
GC	4,312±2,51	3,849±1,93	2,539±2,20
AK	0,867±0,39*	0,734±0,55*	2,289±1,26
GA	3,741±1,55	2,943±1,64	2,404±1,40

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT

* $p < 0,05$, - comparados ao respectivo controle (GC)

Figura 24 - Efeitos do ácido caurenóico e da l-arginina sobre atividade de MPO, na pele (U MPO/g tecido) de ratos saudáveis comparados ao controle (GC), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado

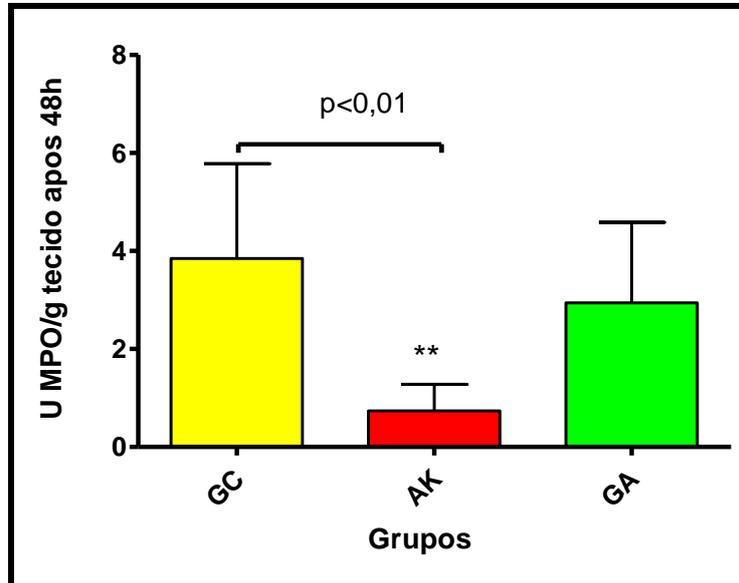


FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT, * $p < 0,05$, - comparados ao respectivo controle (GC)

* $p < 0,05$, - comparado ao respectivo controle (GC)

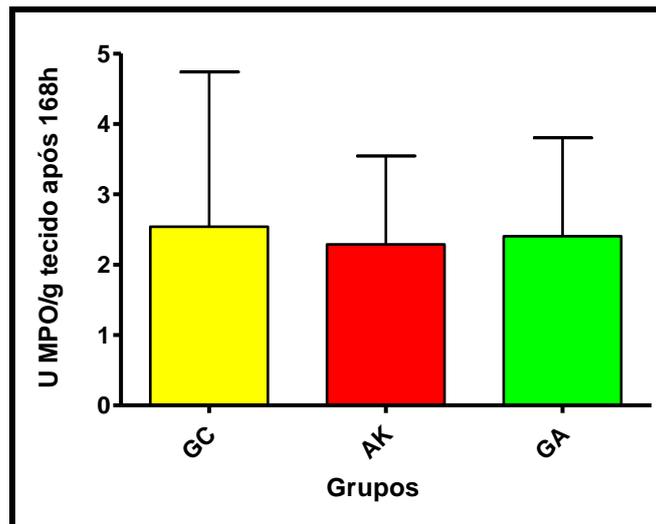
Figura 25 - Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre atividade de MPO, na pele (U MPO/g tecido) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 48h da construção do retalho cutâneo randomizado



FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT ** $p < 0,01$ - comparados ao respectivo controle (GC)

Figura 26 - Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre atividade de MPO, na pele (U MPO/g tecido) de ratos sadios comparados ao controle (GC), decorridas 168h da construção do retalho cutâneo randomizado



FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT - Diferenças não significantes, $p > 0,05$

4.3.6 Efeitos sobre a relação nitrito/nitrato na pele dos ratos

Houve diminuição significativa da relação nitrito/nitrato em todos os grupos estudados, após 24h da construção do retalho cutâneo. Houve aumento significativo da relação nitrito/nitrato após 168h no grupo GA (Tabela 7, Figuras 27-29) .

TABELA 7 - Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre a relação nitrito/nitrato na pele (uM) de ratos saudáveis comparados ao controle (GC), decorridas 24h, 48 e 168 h da construção do retalho cutâneo randomizado

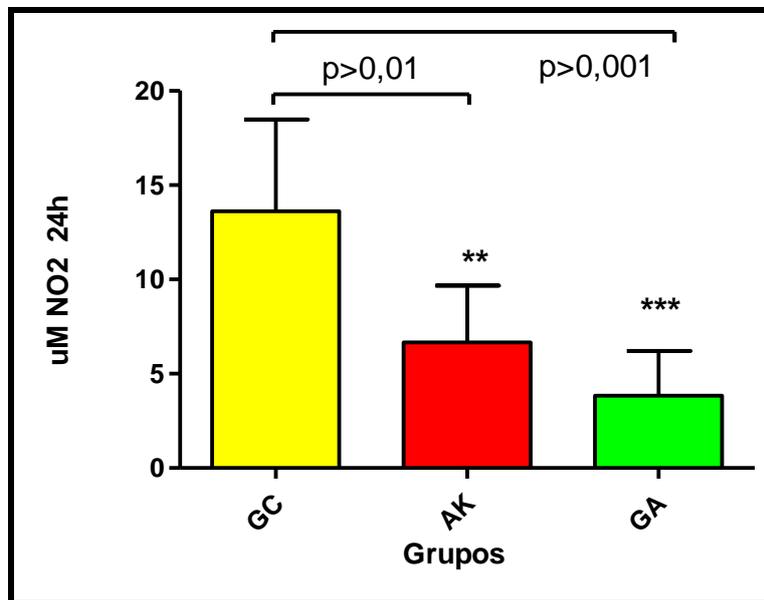
Grupos	Pontos temporais		
	24 h	48 h	168 h
GC	13,6±4,87	3,86±2,95	1,96±2,71
AK	6,67±3,00 **	3,43±2,69	2,68±4,94
GA	3,83±2,38***	1,28±3,41	13,9±8,85**

FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT

** $p < 0,001$, -*** $p < 0,0001$ comparados ao respectivo controle (GC)

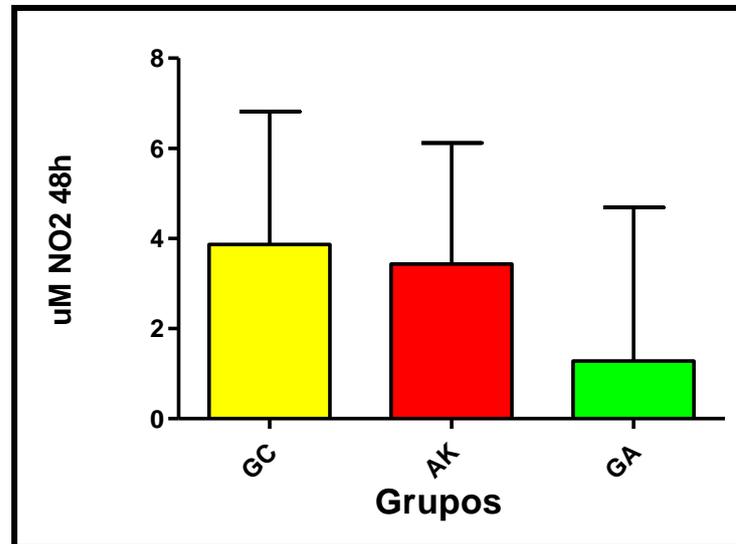
Figura 27- Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre a relação nitrito/nitrato na pele (uM) de ratos saudáveis comparados ao controle (GC), decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado



FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT, ** $p < 0,01$, -*** $p < 0,001$ comparados ao respectivo controle (GC)

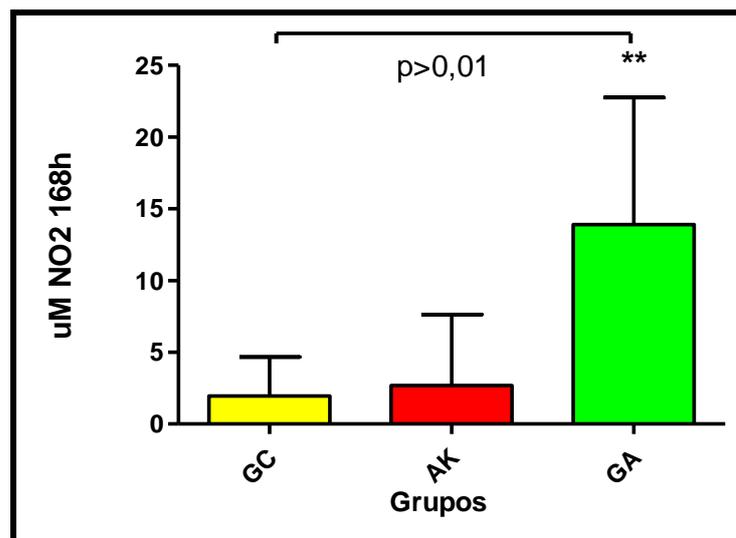
Figura 28- Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre a relação nitrito/nitrato na pele (μM) de ratos saudios comparados ao controle (GC), decorridas 48h da construção do retalho cutâneo randomizado



FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT, diferenças não significantes

Figura 29- Efeitos do ácido caurenico e da l-arginina sobre a relação nitrito/nitrato na pele (μM) de ratos saudios comparados ao controle (GC), decorridas 168 h da construção do retalho cutâneo randomizado



FONTE: O Autor (2014)

Nota: Teste: ANOVA/ DUNNETT, ** $p < 0,01$ comparado ao respectivo controle (GC)

5 DISCUSSÃO

O rato foi o animal de experimentação escolhido para esse estudo. É um mamífero de baixo custo, apresenta elevada resistência à infecção e ao trauma cirúrgico (FESTING, 1979) e, já foi utilizado por grande número de pesquisadores, no estudo dos efeitos da isquemia-reperfusão em retalhos cutâneos randomizados do dorso (Quadro 1, Anexo A). Optou-se por utilizar animais em um intervalo de peso entre 150g e 300g, cuja normalidade da distribuição desse peso no experimento foi comprovada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (Apêndice B).

A técnica anestésica utilizada consistiu na associação do cloridrato de ketamina (90mg/kg de peso corporal) com xilazina (10mg/kg de peso corporal), administrados por via intraperitoneal, técnica utilizada por alguns autores (GHAVAMI; NUTT; HARDY, 2002; SARIFAKIOGLU *et al.*, 2004; AYDOGAN *et al.*, 2006; MEIRER *et al.*, 2007). O cloridrato de ketamina (ketalar) cuja dose varia entre 15 a 100mg/kg, dependendo da via de administração e da associação deste com outros anestésicos, produz um tipo de anestesia dissociativa entre o córtex e o tálamo. Causa analgesia, sem perda total dos reflexos protetores. (SCHANAIDER; SILVA, 2004). A xilazina (Rompum) é utilizada na dose de 3 a 10mg. A combinação ketamina e xilazina por via intramuscular ou intraperitoneal, mantém o animal em plano anestésico de 40 a 60 minutos, com possibilidade de reforço da dose, caso se prolongue o tempo cirúrgico. (SCHANAIDER; SILVA, 2004).

Nesse estudo foi utilizado, como modelo experimental, o retalho cutâneo randomizado do dorso do rato, medindo 8cm de comprimento por 2,5cm de largura, com base distal. Encontram-se, na literatura científica, retalhos de dorso e da face ventral de ratos, com dimensões variadas. O modelo utilizado nesse experimento foi baseado no retalho idealizado por McFarlane (1965), onde consistia em retalho retangular de dorso de rato, medindo 10cm por 4cm, com base cranial e modificado por Sarifakioglu *et al.* (2004), medindo 8cm de comprimento por 2,5cm de largura, de base caudal. Na região distal dos retalhos cutâneos randomizados, o fluxo sanguíneo diminui inicialmente, para aumentar significativamente após as 24 horas que se seguem à sua elevação. Essa região (distal) constitui um estado de isquemia incompleta, com lesão tecidual (AYDOGAN *et al.*, 2006). No rato, a camada muscular ou *panniculus carnosus* é aderida à cútis e frouxamente à fascia profunda, enquanto que, no ser humano, a gordura superficial ou *panniculus adiposus* é mais

firmemente aderida à fáscia profunda. Quanto à irrigação cutânea, essas camadas são comparáveis, pela grande quantidade de vasos presentes (FREIRE *et al.*, 2003; CYMROT; PERCÁRIO; FERREIRA, 2004). Entretanto, a elevação do retalho de pele ocasiona um estado hiperadrenérgico, inicialmente; após a secção dos nervos simpáticos, por acúmulo de noradrenalina. A vasoconstrição resultante induz à oclusão capilar temporária, porém, completa. Essas condições são compatíveis, com a já bem descrita, síndrome de isquemia e reperfusão, onde são gerados radicais livres (CYMROT; PERCÁRIO; FERREIRA, 2004). No entanto, ao longo de um retalho isquêmico existe uma área em que a sobrevida cutânea é esperada (porção proximal), pois, o aporte de oxigênio é adequado ao metabolismo celular. Em outra (porção distal), a necrose é mais provável, pela incapacidade de manutenção metabólica necessária. Entre essas duas, há uma área denominada de “zona de transição”, submetida a um período de isquemia, seguida por gradual reperfusão, onde uma adequada manipulação farmacológica tentaria diminuir a possibilidade de necrose (CYMROT; PERCÁRIO; FERREIRA, 2004). Nesse estudo, essa zona de transição no retalho cutâneo do animal, foi a área utilizada para coleta e dosagem laboratorial do Malondialdeído, glutathione (tióis não proteicos), mieloperoxidase, IL-1, TNF- α , nitrito/nitrato (Nox)

Todavia, a partir do terceiro dia de pós-operatório são identificados sinais de neovascularização no retalho cutâneo, desde o leito receptor e da área cutânea vizinha, onde o pedículo secundário estará completo em torno de nove dias (ALMEIDA *et al.*, 2004). Nesse estudo, o período de observação final dos retalhos cutâneos randomizados foi estabelecido no 7^o. dia de pós-operatório, tendo em vista que, nessa data, já está bem definida a eventual área de necrose, além do processo de angiogênese e formação de neovascularização, a partir do leito receptor e da área perimetral já estarem instaladas (ALMEIDA *et al.*, 2004). O acompanhamento diário dos animais não evidenciou qualquer comprometimento da ferida operatória.

Isquemia/reperfusão (I/R) é a perda parcial subjacente do retalho. Com a cirurgia de retalho, tornando-se cada vez mais e mais importante, é importante ter conhecimento em cirurgia reconstrutiva, das causas de lesão por isquemia/reperfusão a fim de impedi-la. (HEUVEL *et al.*, 2009)

Isquemia é uma condição de fluxo sanguíneo inadequado para uma área de tecido específico. Caso o período de isquemia alcance a tolerância do tecido, a inflamação se desenvolverá, tendo como consequência a necrose. Além disso, após

a reperfusão, ocorre uma cascata de eventos fisiopatológicos resultando em dano tecidual aumentado. Um grande número de profissionais médicos, clinicamente, é confrontado com o efeito da lesão por isquemia/reperfusão em diferentes órgãos. Pode causar morbidade do paciente, bem como, a hospitalização prolongada, aumentando a necessidade de médicos e, portanto, os custos médicos. Além disso, a lesão por isquemia/reperfusão, também, é uma causa importante na disfunção de tecidos ou órgãos transplantados, levando à insuficiência do órgão transplantado e uma maior incidência de rejeição aguda, bem como, crônica do transplante. (HEUVEL *et al.*, 2009)

Um tipo específico de transplante é a transferência de retalho livre em cirurgia reconstrutiva. Esta é uma forma de transplante autólogo, onde o tecido é transferido para outra parte do corpo do paciente. O transplante de retalho livre é bem sucedido em 90 a 95% dos casos. No entanto, embora a cirurgia de retalho é, geralmente, bem sucedida, uma porcentagem pequena dos pacientes mostram sinais de lesão pós-operatória por isquemia/reperfusão. Às vezes, isso pode resultar em perda parcial ou completa do retalho, o que pode ser traumático para o paciente. O transplante autólogo é diferente de outros tipos de transplante porque as reações imunológicas podem não ocorrer, conseqüentemente não havendo a rejeição. Portanto, o retalho livre é um modelo ideal para estudar os efeitos isolados da lesão por isquemia/reperfusão. (HEUVEL *et al.*, 2009)

Durante a isquemia e especialmente durante a reperfusão, espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas. As ROS incluem íons de oxigênio, os radicais livres e peróxidos e iniciam danos conseqüentes ao fenômeno isquemia/reperfusão. Eles são derivados de dois diferentes processos: o sistema xantina oxidase em células do endotélio e o sistema oxidase fosfato dinucleótido nicotinamida e adenina (NADPH) em neutrófilos. A formação de ROS em neutrófilos durante a isquemia/reperfusão são referidas como uma ruptura respiratória. As ROS que são formadas durante a reperfusão podem causar uma série de alterações que prejudicam a microcirculação, por exemplo, edema das células do endotélio, vasoconstrição e aumento da permeabilidade capilar. Estes mecanismos foram demonstrados em estudos em animais. No entanto, durante a isquemia de retalho de pele há um significativo aumento da regulação do sistema xantina oxidase. Este sistema é provavelmente uma das principais fontes de produção de ROS durante a isquemia. A administração sistêmica de alopurinol, que inibe o sistema de xantina

oxidase, reduz a formação de ROS e significativamente, aumenta a taxa de sobrevivência dos retalhos de pele de rato. (HEUVEL *et al.*, 2009)

Antioxidantes são compostos que possuem a capacidade de neutralizar ROS e assim evitar danos aos tecidos. Eles doam elétrons para liberar radicais para essa finalidade. Alguns antioxidantes são produzidos endogenamente no corpo (e. g., glutathiona (GSH), ubiquinóis, ácido úrico) e outros, são fornecidos através da dieta, os chamados antioxidantes exógenos (e. g., vitamina C e E, ácidos graxos, riboflavina e os carotenóides). Antioxidantes podem prevenir dano tecidual por neutralização de ROS. O aumento da produção de ROS e ou a diminuição da defesa antioxidante pode ser definida como estresse oxidativo. É sabido que durante o estresse oxidativo, ocorre no corpo a regulação de antioxidantes endógenos. No entanto, durante a reperfusão, muitas ROS evoluem em um curto período de tempo, inundando, assim, o sistema antioxidante. Há um rápido consumo de antioxidantes e concentrações em declínio no corpo. Esta queda nos níveis de antioxidantes após isquemia/reperfusão sugere que os pacientes que sofrem desta condição podem se beneficiar da terapia com antioxidantes. De literatura é conhecido que, a administração de antioxidantes, antes ou durante a isquemia/reperfusão tem efeitos protetores e que também melhora o funcionamento de órgãos, mesmo a longo prazo. (HEUVEL *et al.*, 2009)

Estudos em animais mostraram que a administração de vários antioxidantes melhora a sobrevivência e a função de retalhos de pele. A GSH, por exemplo, é um dos mais importantes antioxidantes que protege o corpo do estresse oxidativo. Em um estudo de retalho em rato, os níveis de GSH foram significativamente menor após isquemia/reperfusão do que em controles. Além disso, a inibição da produção endógena de GSH durante a isquemia/reperfusão provoca um aumento nos danos teciduais. (HEUVEL *et al.*, 2009)

O segundo aspecto importante da lesão por isquemia/reperfusão é o maciço influxo de neutrófilos. O recrutamento de leucócitos durante a reperfusão é um processo de várias etapas em que a formação de ROS contribui para a quimiotaxia e ativação de moléculas de adesão que levam à infiltração dos neutrófilos. O processo de extravasamento de leucócitos é dividido em três passos: rolamento, firme adesão e transmigração. O rolamento de neutrófilos reduz sua velocidade e estimula o contato endotelial. Em seguida, os leucócitos aderem firmemente ao endotélio e finalmente migram para o tecido. (HEUVEL *et al.*, 2009)

A infiltração dos neutrófilos após isquemia é demonstrado em diferentes modelos animais de retalhos de pele. A mieloperoxidase é uma enzima que tem atividade específica em neutrófilos e é amplamente utilizada como um marcador de enzima para o grau de influxo dos neutrófilos. Em um estudo em ratos, os retalhos destinados a sofrer necrose mostraram significativamente uma maior atividade da mieloperoxidase do que os retalhos que sobreviveram. Os neutrófilos são parte da resposta local inflamatória e produzem radicais livres através do sistema NADPH oxidase durante a explosão respiratória. A inibição do influxo dos neutrófilos irá reduzir a quantidade de radicais livres presentes. Tem sido demonstrado que depleção de neutrófilos ou inibição da ativação de neutrófilos atenua fortemente a lesão por isquemia/reperfusão. O pré-tratamento com uma droga imunossupressora reduziu significativamente a infiltração dos neutrófilos e melhorou a sobrevivência dos retalhos. Portanto, isso também poderia ser uma chave na prevenção de lesões por isquemia/reperfusão. (HEUVEL *et al.*, 2009)

O terceiro mecanismo importante da isquemia/reperfusão é a depleção do óxido nítrico (NO). A L-arginina é um aminoácido que tem efeitos imunoestimulatórios e melhora a cicatrização e função imunológica em pacientes catabólicos. A L-arginina é um precursor do NO (anteriormente chamado de “fator relaxante derivado do endotélio”. Em neurônios e células do endotélio, a L-arginina é convertida em NO pela enzima NO-sintase (NOS). O NO promove uma proteção; bem como, prejudicial papel na lesão I/R. Ele protege os tecidos da lesão por isquemia/reperfusão através da regulação do tônus vascular, inibição da agregação de trombócitos e adesão, a inibição da adesão dos leucócitos ao endotélio, eliminação de radicais livres, a manutenção da permeabilidade vascular normal, a inibição de proliferação de músculo liso, o fortalecimento do sistema imunológico e estimulação da regeneração de células do endotélio. No entanto, o NO também pode agravar a lesão por isquemia/reperfusão. Os efeitos contraditórios do NO podem ser um resultado da expressão de diferentes isoformas de NOS: 'NOS constitutiva '(cNOS) e 'NOS induzível '(iNOS). A enzima iNOS parece contribuir para o desenvolvimento da lesão por isquemia/reperfusão. Acredita-se que por reagir quimicamente com os radicais de oxigênio para formar peroxinitrito. Isso causa a peroxidação de gordura, levando a danos adicionais na reperfusão, através de um aumento da produção de radicais livres. A inibição da iNOS durante a isquemia neutraliza a lesão e a necrose dos tecidos. (HEUVEL *et al.*, 2009)

A produção de NO por cNOS normalmente exerce efeitos de proteção através da inibição da agregação e adesão de trombócitos e neutrófilos. No entanto, no início da isquemia, cNOS produz grandes concentrações de NO, causando uma depleção local do seu precursor, a L-arginina. Como consequência desta baixa concentração de L-arginina, o NO pode já não ser produzido pelo endotélio e, radicais livres de oxigênio são produzidos em vez de NO. Estes podem ser responsáveis por 70% dos radicais livres de oxigênio, que são produzidos durante a reperfusão. A diminuição na concentração de NO causa vasoconstrição, obstrução capilar por neutrófilos e formação de trombos na microcirculação. A administração de L-arginina pode ser benéfica em proteger os níveis de cNOS, apoiando assim a microcirculação e melhorando a viabilidade dos retalhos. O papel exato do metabolismo da arginina/NO na lesão por isquemia/reperfusão, ainda não está claro, porém, mais e mais evidências apontam na direção de um efeito protetor da arginina e NO. (HEUVEL *et al.*, 2009)

A última característica importante da isquemia/reperfusão é a apoptose. Apoptose é um mecanismo ativamente regulamentado de morte celular e é caracterizado pela fragmentação de DNA internucleosomal. Isto ocorre relativamente tarde no processo de apoptose. A função da apoptose é remover células redundantes e limpar as células envelhecidas ou danificadas em tecidos desenvolvidos. O processo de apoptose pode ser reversível. A necrose, em outras mãos, é um processo de morte celular não regulamentado, que é caracterizado por inflamação. Apoptose e necrose inicialmente foram pensados serem duas entidades completamente diferentes; no entanto, parece haver semelhanças nos seus mecanismos de evolução. (HEUVEL *et al.*, 2009)

A reperfusão é marcada pela inflamação e o lançamento do conteúdo da célula, combinando um processo necrótico de morte celular. No entanto, a apoptose parece contribuir significativamente para a morte celular após a lesão de isquemia/reperfusão. Durante a reperfusão, ROS causam danos ao DNA e às mitocôndrias, os quais são os dois poderosos indutores de apoptose. Como resultado, uma cascata de caspases é ativada. Isso causa mudanças morfológicas que são associadas com a apoptose, por exemplo, diminuição de células. Notavelmente, a apoptose ocorre sem lise de membrana ou inflamação. Um estudo com rato confirmou o papel da apoptose, demonstrando um aumento significativo no

tempo crítico de isquemia primária de retalhos fasciocutâneos após pré-tratamento com um inibidor da caspase. (HEUVEL *et al.*, 2009)

Entretanto, ainda não está claro se necrose ou apoptose é o tipo dominante de morte celular após lesão por isquemia/reperfusão. Possivelmente é um processo de apoptose que não pode ser concluída e, portanto, se transforma em necrose secundária. É conhecido que atrasada ou inibida, a remoção de células apoptóticas pelos fagócitos resulta em necrose secundária dentro de horas. Esta busca é suportada pela pesquisa sobre lesão hepática por isquemia/reperfusão, mostrando que, durante a primeira hora de reperfusão o número de células apoptóticas aumenta significativamente. No entanto, a quantidade total de apoptose parece ser menor que 5%. A porção de necrose, em outras mãos, aumenta progressivamente durante a reperfusão e parece ser o modo predominante de morte celular. (HEUVEL *et al.*, 2009)

Não obstante, o ácido caurenóico (ácido ent-kaur-16-en-19-oic,) é um intermediário na biossíntese de numerosas plantas e metabólitos fúngicos secundários, incluindo giberelinas, o fitohormônio envolvido na regulação do crescimento e desenvolvimento de plantas superiores, abundantemente encontrados em alguns espécies brasileiras como *Wedelia paludosa* D. C. (Asteraceae), *Xylopia frutescens* e *glabra* de *Annona* (Annonaceae) e *Copaifera langsdorffii*. Entre as atividades biológicas mais recentemente relatadas para o ácido caurenóico, destacam-se as antimicrobianas, anti-inflamatória, anticancerígeno (efeitos citotóxicos e ações antiproliferativas, em culturas de células tumorais, cânceres de mama e de cólon em humanos e leucemia), anticonvulsivante antiprotozoário, atividade moluscicida, agregação antiplaquetária, analgésico, antifúngico, relaxante do músculo liso, hipoglicêmica, citotóxicos e efeitos embriotóxicos. (BATISTA *et al.*, 2007) (VIEIRA *et al.*, 2002) (OKOYE *et al.*, 2013) (MEDINA *et al.*, 2009) (LIZARTE NETO *et al.*, 2013) (GIL *et al.*, 2006). Entretando, ácido caurenóico foi descrito que inibe as contrações induzidas eletricamente em íleo de cobaia; assim como, foi demonstrado que o ácido caurenóico exibe ação antiespasmódica no músculo liso vascular. O diterpeno inibiu a contração induzida por uma única concentração de KCl e reduziu a contração induzida por fenilefrina na artéria carótida de rato isolado com o endotélio intacto. Mais recentemente, temos provas de que o ácido caurenóico relaxa segmentos do endotélio intacto da artéria carótida de ratos precontraidos, quer com fenilefrina ou KCl. (TIRAPELLI *et al.*, 2004) Ainda mais, tem

havido relatos sobre o efeito diurético, vasorelaxante, e anti-inflamatório do ácido caurenóico em roedores (CAVALCANTI et al., 2006)

Entretanto, a L-arginina-2-amino-5-guanidino-pentanóico é, um aminoácido proteínogênico condicionalmente essencial, sendo, também, um constituinte natural de proteínas dietéticas. Uma vez que o isolamento inicial de L-arginina aconteceu em 1886, pesquisadores tem avaliado seu potencial uso médico. Em adição ao seu papel no metabolismo das proteínas, a L-arginina está envolvida em várias vias metabólicas, tais como a síntese de creatina, L-ornitina, L-glutamato, e poliaminas. A descarboxilação da L-arginina pode produzir agmatina, um metabólito das aminas biogênicas. A L-arginina também está envolvida em degradação da proteína pela via da ubiquitina-proteassoma. Uma via biologicamente importante envolve a L-arginina como o substrato de uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOSs). Três diferentes isoformas de NOS foram isoladas e nomeadas de acordo com o tipo de célula da qual foram primeiramente isoladas: (1) NOS neuronal – nNOS, NOS I; (2) NOS induzida - iNOS, NOS II; e (3) NOS endotelial - eNOS, NOS III. Ambos nNOS e eNOS estão expressas constitutivamente; a sua atividade é regulada por cálcio / calmodulina; e elas não produzem a preços baixos. Recentemente, tem sido observada a regulação expressional de eNOS, indicando que a discriminação simples entre enzimas constitutivamente e indutivelmente expressas não é mais correta; no entanto, esta nomenclatura ainda é largamente utilizada. O mecanismo da reação de NOSs envolve a transferência de elétron-2 da molécula de oxigênio, através de um número de co-fatores para L-arginina, resultando na liberação de NO e L-citrulina. N-hidroxi-L-arginina é formado como um relativamente estável produto intermédio desta reação. (BÖGER, 2014)

No entanto, o NO possui uma gama de papéis críticos na regulação da função de diversos órgãos por todo o corpo, dependendo do tipo de célula e tecido e, a isoforma NOS responsável. O NO desempenha um papel importante como mediador adrenérgico, neurotransmissão colinérgica; aprendizagem e memória; plasticidade sináptica; e neuroproteção. No sistema cardiovascular, o NO produzido por eNOS nas respostas à estimulação de mecanorreceptores pelo estresse do cisalhamento do sangue fluído é criticamente importante para a homeostase do tônus vascular; para interações entre as células do sangue em circulação e da parede vascular, principalmente trombócitos e leucócitos; e para a estrutura vascular. Estas funções têm sido avaliadas extensivamente nos últimos anos. A formação prejudicada ou a

função do NO na vasculatura é um importante fator patogênico no desenvolvimento de doenças vasculares, tais como a aterosclerose, hipertensão, diabetes e a angiopatia. A superprodução de NO por iNOS, em outras mãos, tem sido demonstrado ser uma das principais causas de perda da resistência arterial em estado de choque séptico. Outro estudo concluiu que a exposição à endotoxina leva a aorta a liberar uma substância que causa vasodilatação das arteríolas por regulação da iNOS. Por conseguinte, a concentração plasmática da L-arginina é firmemente regulada e vias metabólicas que são L-arginina dependentes são crítico determinantes de várias condições fisiopatológicas. As quantidades relativas de L-arginina em várias proteínas variam de 3% a 15%. A proteína de soja, amendoim, nozes, e peixes são relativamente ricos em L-arginina, com cerca de 7% dos aminoácidos sendo a L-arginina em peixes e aproximadamente 15% em nozes. Em contraste, os cereais são fontes de proteína que são comparativamente desprovida de L-arginina, com apenas 3% a 4% ao seu baixo teor em proteína sendo a L-arginina. Portanto, diferentes hábitos alimentares entre as populações podem explicar as diferenças nos níveis plasmáticos de L-arginina em várias partes do mundo. A gama habitual dos seus níveis de plasma tem sido determinada como $81,6 \pm 7,3$ mmol / L em homens jovens e $113,7 \pm 19,8$ nmol / L em homens maduros em comparação com $72,4 \pm 6,7$ mmol / L em mulheres jovens e $88,0 \pm 7,8$ mmol / L em mulheres maduras. (BÖGER, 2014)

Embora os níveis de L-arginina intracelular foram demonstrados serem consideravelmente mais elevados do que os níveis no fluido extracelular ou plasma, evidências indicaram que a L-arginina extracelular pode ser rapidamente absorvida pelas células endoteliais e contribuir para a produção de NO. Além disso, a L-arginina na dieta é absorvida no intestino delgado e transportada para o fígado, onde a maior parte é retomada e utilizada no ciclo da ureia hepática; no entanto, uma pequena parte de L-arginina na dieta passa através do fígado e é utilizada como um substrato para a produção de NO, como evidenciado por estudos em animal e seres humanos que utilizaram a L-arginina como precursor. (BÖGER, 2014)

Contudo, a L-arginina tem sido extensivamente estudada como um precursor para a síntese de NO em seres humanos. Um aspecto peculiar destes estudos foi a de que os primeiros foram realizados com altas doses intravenosas, e doses baixas têm sido apenas recentemente adotadas em estudos de suplementação oral. No início, altas doses resultam de relatórios sobre a capacidade da L-arginina para

estimular a secreção do hormônio do crescimento. Uma única dose tão alta como 30 g de L-arginina, administrado por via intravenosa durante um período de 30 minutos, foi mostrada para induzir vasodilatação em seres humanos. Esta vasodilatação apareceu rapidamente depois do início da infusão para os participantes saudáveis, e foi reprodutível em pacientes com doença arterial e doença arterial coronariana, mas, não em pacientes com hipertensão pulmonar primária. A vasodilatação induzida por L-arginina foi associada ao aumento da liberação de metabólitos do NO, nitrito e nitrato, em urina. Estes dados sugeriram que a reação era NO-dependente; No entanto, estudos posteriores demonstraram que a liberação do hormônio induzida por tais doses elevadas de L-arginina também contribuíram para o efeito vasodilatador. Em um estudo, a L-arginina intravenosa conduziu a um aumento significativo no plasma, da concentração do hormônio do crescimento e da insulina, e este efeito endócrino da L-arginina foi bloqueada pela administração da somatostatina, e o efeito vasodilatador foi parcialmente abolido. Outro estudo em indivíduos saudáveis, também, mostrou a liberação de hormônio do crescimento após administração intravenosa de L-arginina, e este efeito foi antagonizado pelo tratamento prévio com octreotida, restaurada pela co-administração do hormônio do crescimento recombinante com L-arginina. Um estudo em animais mais recente demonstrou que uma injeção de arginina-vasopressina (0,3 nmol / kg) provocou um aumento significativo na secreção de hormônio adrenocorticotrófico e hormônio do crescimento, mas a insulina e o glucagon não foram afetados. (BÖGER, 2014)

No entanto, embora os níveis plasmáticos de L-arginina foram relatados se manterem inalterados em doença vascular em todos os estudos, com uma exceção, é possível que a disponibilidade local de L-arginina como um substrato para NOS pode, contudo, ser reduzido pela atividade da arginase. A arginase utiliza a L-arginina para a produção de uréia e ornitina e, portanto, compete com a NOS pela disponibilidade do substrato. Vários estudos têm demonstrado que a indução ou ativação da arginase I ou II pode conduzir a produção prejudicada de NO e disfunção endotelial. Embora, surgiram evidências de que a acumulação de dimetilarginina assimétrica (ADMA) prejudica a formação de NO em certas condições fisiopatológicas. A relação de níveis elevados de ADMA para doença cardiovascular foi revisto recentemente. A ADMA compete com a L-arginina pela ligação a NOS e, portanto, antagoniza competitivamente a enzima de atividade catalítica, dando

origem à hipótese de que a L-arginina pode ser benéfica em pacientes com a ADMA elevados, mas não tem nenhum efeito sobre os mecanismos dependentes de NO em indivíduos com níveis baixos ou normais de ADMA. (BÖGER, 2014)

No entanto, os dados atualmente disponíveis apontam para o fato de que por via oral a suplementação com L-arginina pode afetar as funções vasculares mediadas pelo endotélio, tal como o reforço de vasodilatação, agregação plaquetária decrescente, e redução da adesão dos monócitos no endotélio. Estes efeitos ocorrem quando as concentrações de L-arginina no plasma são elevadas minimamente acima da concentração fisiológica.. Em concentrações de L-arginina superior ao plasma, tal como aquelas alcançadas durante a infusão intravenosa ou intra-arterial , outros efeitos que não são diretamente ligados a produção de NO podem ser observados, tais como, a liberação de hormônio e inespecífica vasodilatação. (BÖGER, 2014)

Todavia, as citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDa. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinas ativadas por mitógenos. Diferentemente dos hormônios clássicos, as citocinas não são armazenadas como moléculas preformadas e atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras). Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, fenômeno denominado pleiotropia. As citocinas são redundantes em suas atividades, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes citocinas. Com frequência, são formadas em cascata, ou seja, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas. Essas substâncias se ligam a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Dessa forma, as citocinas influenciam a atividade, a diferenciação, a proliferação e a sobrevivência da célula imunológica, assim como regulam a produção e a atividade de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. Algumas citocinas podem ter ações pró- (Th1) ou anti-inflamatórias (Th2), de acordo com o microambiente no qual estão localizadas. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, temos as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e TNF (fator de necrose tumoral). As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e FTCSβ (fator transformador de crescimento β). (OLIVEIRA *et al.* 2011)

As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão, favorecendo a cicatrização apropriada da ferida. No entanto, a produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias a partir da lesão pode manifestar-se sistemicamente com instabilidade hemodinâmica ou distúrbios metabólicos. Após lesões ou infecções graves, a resposta exacerbada e persistente de citocinas Th1 pode contribuir para lesões em órgão-alvo, levando à insuficiência de múltiplos órgãos e à morte. As citocinas Th2 podem minimizar alguns desses efeitos indesejáveis. (OLIVEIRA *et al.* 2011)

Não obstante, a IL-1 é primariamente produzida por macrófagos e monócitos, assim como por células não imunológicas, tais como fibroblastos e células endoteliais ativadas durante lesão celular, infecção, invasão e inflamação. Há dois tipos conhecidos: IL-1 α e IL-1 β , com 31 a 33 kDa cada. Estes atuam sobre os mesmos receptores, IL-1RI e IL-1RII. O IL-1RI é considerado o receptor ativo, enquanto o IL-1RII não possui uma molécula de transdução e é funcionalmente inativo. A IL-1 α é marcadamente associada a membranas celulares e age através de contatos celulares. Já a IL-1 β é sintetizada como uma proteína precursora (Pro-IL-1 β), que não é secretada na forma ativa até ser metabolizada pela enzima caspase-1. Recentemente, descobriu-se que IL-1 β é expressa em neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal. A IL-1 β produz inflamação sistêmica através da ativação no hipotálamo anterior, causando febre. Também produz substância-P(SP), óxido nítrico (ativando a enzima óxido nítrico sintetase) e moléculas de adesão endotelial. Tem importante função no desenvolvimento e na manutenção da dor pós-operatória da ciclooxigenase-2, com a formação de PGE2. A IL-1AR (antagonista de receptor) também é liberada durante lesão tecidual e não tem efeito agonista tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Assim, ela compete com os mesmos receptores da IL-1, atuando como um autorregulador endógeno. Embora tenha meia-vida plasmática de apenas 6 minutos, recentemente tem-se sugerido que a IL-1 tem importante função no desenvolvimento e na manutenção da dor pós-operatória. (OLIVEIRA *et al.* 2011)

Todavia, o TNF α , também conhecido como caquetina, é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T, que são abundantes no peritônio e no tecido esplâncnico. Também está presente nos neurônios e células da glia, desempenhando funções importantes tanto na hiperalgesia inflamatória quanto na neuropática. O TNF existe em duas formas: uma transmembrana de 26 kDa e outra secretada de 17 kDa, ambas biologicamente

ativas. É estruturalmente relacionada à linfotóxina- α (LT α , também chamada TNF β), tendo os mesmos receptores, TNFR1 (55 kDa) e TNFR2 (75 kDa). O TNFR1 é expresso exclusivamente em neurônios e está associado à maioria dos efeitos biológicos do TNF α , incluindo respostas inflamatórias e apoptose. Já o TNFR2 manifesta-se principalmente em macrófagos e monócitos no gânglio da raiz dorsal, estimulando a proliferação de linfócitos-T, fibroblastos e células matadoras naturais. Após procedimento cirúrgico, trauma ou durante as infecções, o TNF α é um dos mediadores mais precoces e potentes da resposta inflamatória. Embora sua meia-vida plasmática seja de apenas 20 minutos, é suficiente para provocar mudanças metabólicas e hemodinâmicas importantes e ativar distalmente outras citocinas. O TNF α é um potente indutor de metabolismo muscular e caquexia, por estimular a lipólise e inibir a lipoproteína lipase. Outras ações do TNF α consistem em: ativar a coagulação, estimular a expressão ou liberação de moléculas de adesão, PGE₂, fator ativador de plaquetas, glicocorticoides e eicosanóides, e influenciar a apoptose celular. O TNF α apresenta grande afinidade por receptores solúveis de TNF (sTNFRs), que são derivados dos domínios extracelulares dos TNFRs. A ativação de sTNFRs produz resposta antagonista endógena à atividade sistêmica excessiva do TNF α . Entretanto, deve-se perceber que os sTNFRs podem causar efeitos indesejáveis, pois servem como transportadores ou reservas bioativas de TNF α na circulação. (OLIVEIRA *et al.* 2011)

Não obstante, no presente estudo, o ácido caurenóico promoveu diminuição significativa da expressão de IL-1, em relação ao grupo controle, decorridas 24h e 48h da construção do retalho cutâneo randomizado (Tabela 02, Figuras 12 e 13), ação que não ocorreu com 168 horas; evidenciando ação anti-inflamatória do ácido caurenóico nos dois primeiros tempos do estudo em questão.

Por conseguinte, no presente estudo, o ácido caurenóico promoveu diminuição significativa da expressão de TNF α , decorridas 24h e 48h da construção do retalho cutâneo randomizado, (Tabela 03, Figuras 15 e 16), efeito não ocorrido com 168h; evidenciando ação anti-inflamatória nos dois primeiros tempos do estudo em questão.

Em experiências *in vitro* também demonstraram que inibe a induzida por LPS a produção de óxido nítrico e prostaglandina E; bem como, a expressão de ciclo-oxigenase-2 e de NO induzível sintase (iNOS) na RAW 264.7 de macrófagos. Os

efeitos biológicos adicionais relevantes do ácido caurenóico são o efeito vasorrelaxante via NO/monofosfato guanosina cíclico (cGMP)/proteína quinase G/ (PKG)/canais de cálcio e potássio sensível ao ATP, dependendo do modelo experimental e efeitos antimicrobianos contra *Bacillus cereus* e *Mycobacterium tuberculosis*. No entanto, doenças reumáticas, como a artrite reumatoide, são acompanhadas por dor. Conseqüentemente, tem sido demonstrado que o ácido caurenóico inibe a resposta de contorção ácido-induzida em camundongos. No entanto, se ou não o ácido caurenóico inibe a dor inflamatória em outros modelos e, também os seus mecanismos analgésicos de ação, ainda não foram determinados. . (MIZOKAMI *et al.*, 2012)

Em termos de dor inflamatória, a sensibilização de neurônios primários nociceptivos (nociceptores) ocorre durante a inflamação, produção de um aumento na sensação de dor (hiperalgesia). Esta sensibilização é causada pela ação direta de mediadores inflamatórios, tais como prostaglandinas (por exemplo, PGE2, PGI) e aminas simpáticas (por exemplo, a dopamina, epinefrina) em seus receptores presentes na membrana dos nociceptores. Isso é, também, aceito que a liberação desses mediadores hiperalgésicos de ação direta é precedida pelo lançamento de uma cascata de citocinas. No modelo de inflamação de pata de carragenina, esta cascata é iniciada com a liberação de TNF- α e quimiocina CXCL1. Estes desencadeiam a produção de IL-1 β , que, por sua vez, induz a produção de prostaglandina. A CXCL1 é, também, responsável pela estimulação do componente simpático de dor inflamatória. Além disso, o aumento da atenção foi atraída para a ativação através da via NO cíclico GMP-PKG-canal de potássio sensível ao ATP (óxido nítrico/monofosfato guanosina cíclica/proteína quinase G/canal de potássio sensível ao ATP), como uma via de sinalização analgésica importante, uma vez que a morfina e outros medicamentos ativam esta via de sinalização. Em adição à hiperalgesia inflamatória, o ácido caurenóico inibe o edema de pata induzida pela carragenina, suportando um potencial mais amplo de aplicabilidade terapêutica do ácido caurenóico em condições inflamatórias. . (MIZOKAMI *et al.*, 2012)

A hiperalgesia inflamatória induzida pela carragenina é induzida por uma cascata de citocinas. Por sua vez, o papel das citocinas na hiperalgesia é mediada pela produção de mediadores sensíveis, tais como a PGE2 e aminas simpáticas. Mizokami *et al.* (2012) realizaram um experimento, onde os ratos foram tratados com ácido caurenóico (10 mg / kg, pré-operatório, 30 min) antes do estímulo da

carragenina (100 ng / pata). Três horas após a injeção de carragenina, os ratos foram anestesiados terminalmente e o tecido cutâneo plantar foi recolhido para dosagem de citocinas (TNF- α e IL-1 β). O ácido caurenóico inibiu a produção de TNF- α e IL-1 β em tecido da pata induzida pela carragenina. Esta inibição da produção de citocinas por ácido caurenóico, poderia explicar a inibição da expressão da ciclo-oxigenase-2, uma vez que ambas as citocinas a induzem. . (MIZOKAMI *et al.*, 2012)

Além do mais, os presentes dados demonstram a inibição da produção de citocinas por ácido caurenóico, a lançar luz sobre a controvérsia de se tratar de inibir a ativação do NFkB e da expressão de ARNm de TNF- α e IL-1 β como determinada *in vitro*, indicando que estes mecanismos podem ser de importância *in vivo*, e a inibição de produção de citocinas está provavelmente relacionado com a inibição da atividade de NFkB. (MIZOKAMI *et al.*, 2012)

No presente estudo, não ocorreram alterações significantes no grupo L-arginina em nenhum dos pontos temporais estudados, no tocante à expressão de IL-1 e TNF- α (Tabelas 02 e 03; Figuras 12-17), não evidenciando atividades da L-arginina sobre as citocina pró-inflamatórias estudadas.

Por conseguinte, os peróxidos lipídicos, que são derivados a partir de ácidos graxos poli-insaturados, são instáveis. Eles prontamente se decompõem para formar uma série complexa de compostos, que incluem o malondialdeído (MDA). O MDA é o principal metabolito de ácido araquidônico e serve como um biomarcador confiável para o estresse oxidativo. O MDA é um mutagênico, e tumorigênico, altamente reativo produzido de três carbondialdeídos durante a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados e do metabolismo do ácido araquidônico. O MDA também é gerado durante a decomposição de prostaglandina endoperoxido (PGH) Em 12 hydroxiheptadecatrienoato (HHT). Tem a fórmula molecular C₃H₄O₂, com massa molar de 72,02 g mol e ponto de ebulição 108° C. Os intervalos de ponto de fusão entre 72-74° C. O aspecto geral do MDA é sólido e como agulha. Tem o pKa de 4,46 e existe como sua base conjugada (O-CH = CH-CHO). O MDA participa em diferentes reações biológicas no interior das células, incluindo ligação covalente para proteínas, RNA e DNA. O monitoramento dos níveis de MDA em diferentes sistemas biológicos pode ser utilizado como um indicador importante de peroxidação lipídica, tanto *in vitro* como *In vivo*, para vários distúrbios de saúde. A formação endógena de MDA durante o estresse oxidativo intracelular e suas reações com formas de

DNA, MDA-DNA aductos que o torna um importante biomarcador de dano no DNA endógeno. A determinação de MDA no plasma sanguíneo ou tecido homogenatos é um dos métodos úteis para prever os níveis de estresse oxidativo. O MDA cai na categoria de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e depois é um índice de lipoperoxidação. Várias técnicas são usadas para medir os níveis de MDA em diferentes amostras, incluindo soro, plasma ou tecidos. O ácido tiobarbitúrico (TBA) de ensaio é o método vulgarmente utilizado para a determinação de MDA. No entanto, o ensaio de TBA é um teste não-específico para MDA como TBA, também, reage com outros aldeídos que podem estar presentes em amostras biológicas. Aquelas entidades, também, formam espécies coloridas que interferem com o ensaio de MDA. Novos métodos analíticos para o isolamento e quantificação dos aductos MDA-TBA foram desenvolvidos incluindo HPLC e cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massa (GC-MS) para melhorar a investigação. (SINGH, 2014)

O hormônio do crescimento foi encontrado como agente responsável por aumentar a lipoperoxidação em ratos, com níveis elevados de malondialdeído, em tecidos de cérebro de ratos recém-nascidos sob hipóxia-isquemia. O MDA no plasma foi determinado como uma função de isquemia e reperfusão em ratos e seres humanos, usando cromatografia líquida de alta eficiência de emparelhamento de íons e, o estudo revelou que a privação de oxigênio induz a produção de uma baixa, porém, detectável quantidade de MDA em ambos, coração e cérebro de ratos, enquanto que a reperfusão provoca acentuado aumento de MDA em ambos os tecidos. Em seres humanos, o MDA plasmático foi afetado apenas em pacientes que sofrem de infarto agudo do miocárdio, com trombólise bem sucedida, indicando, assim, a lesão de tecidos mediada por radicais de oxigênio. O estresse oxidativo foi medido em corações de ratos e humanos, os quais foram temporariamente submetidos a isquemia, determinando-se os níveis de glutathiona oxidada (GSSG) e MDA. (SINGH, 2014)

O MDA é um produto final gerado por decomposição do ácido araquidônico e PUFAs maiores, através de processos enzimático ou não enzimático. A produção de MDA por meio de processos enzimáticos é bem conhecida, mas suas funções biológicas e seu possível duplo papel dose-dependente não têm sido estudados, embora, o MDA é quimicamente mais estável e permeável à membrana do que ROS e menos tóxico do que o metilglioxal (MG). Por outro lado, a produção de MDA

por processos não enzimáticos é, ainda, pouco compreendida, apesar de seu potencial valor terapêutico, porque este MDA é acreditado originar-se sob condições de estresse e tem alta capacidade de reação com várias biomoléculas tais como proteínas ou ADN que leva à formação de aductos, e a produção de MDA excessiva tem sido associada a diferentes estados patológicos. O MDA pode ser gerado in vivo, como um produto secundário, por processos enzimáticos durante a biossíntese do tromboxano A. O TXA₂ é um metabolito biologicamente ativo do ácido araquidônico formado pela ação da sintase de tromboxano A₂, no endoperóxido de prostaglandina ou prostaglandina H₂ (PGH₂). Uma mistura de hidroperóxidos de lípidos é formada durante o processo de peroxidação lipídica. O radical peroxilo dos hidroperóxidos com uma ligação cis-dupla homoalílica permite sua fácil ciclização por adição de radical intramolecular de uma ligação dupla e a formação de um novo radical. Os radicais livres intermediários formados depois da ciclização pode ciclizar novamente para formar endoperóxidos bicíclicos, estruturalmente relacionados às prostaglandinas, e submeter-se à clivagem para produzir MDA. (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014)

Uma vez formado, o MDA pode ser enzimaticamente metabolizado ou pode reagir com proteínas celulares e teciduais ou DNA para formar aductos que resultam em danos biomoleculares. Estudos anteriores mostraram que uma rota bioquímica provável para o metabolismo do MDA envolve a oxidação por aldeído desidrogenase mitocondrial seguido por descarboxilação para produzir acetaldeído que é oxidado pela aldeído desidrogenase em acetato e após, a CO₂ e H₂O. Por outro lado, a fosfoglucoisomerase é, provavelmente, a responsável pela metabolização do MDA citoplasmático a metilglioxal (MG) e adicionalmente a D-lactato, por enzimas do sistema glioxalase, usando GSH como um cofator. Uma porção de MDA é excretada na urina na forma de várias enaminas (RNH-CH-CH-CHO), tais como N-epsilon (2-propenal), lisina ou N-2- (propenal) serina. (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014)

Como um aldeído eletrófilo bifuncional, a reatividade do MDA é Ph-dependente, na qual existe um íon enolato (bases conjugadas tendo uma carga no oxigênio, com ligação dupla C-C adjacente), com baixa reatividade em Ph fisiológico. A alta reatividade do MDA é baseada principalmente em sua eletrofilicidade, tornando-se fortemente reativa com nucleófilos, tais como os resíduos de aminoácidos básicos (por exemplo, lisina, histidina, ou arginina). As reações iniciais entre MDA e aminoácidos livre ou proteína geraram aductos de base de Schiff.

Estes aductos são também referidos como produtos finais de peroxidação lipídica avançada (Ales). O acetaldeído (produto do metabolismo do MDA) sob estresse oxidativo e na presença do MDA gera mais malondialdeído acetaldeído (MAA) aductos. Aductos MAA surgem para serem altamente imunogênicos. Aductos MDA são biologicamente importantes porque eles podem participar de reações secundárias deletérias (por exemplo, reticulação), promovendo reticulação intramolecular ou intermolecular da proteína / ADN que podem induzir profunda alteração nas propriedades bioquímicas de biomoléculas e se acumulam durante o envelhecimento e em doenças crônicas. (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014)

Várias estratégias diferentes têm sido perseguidas para a mensuração de MDA em uma variedade de diferentes matrizes (isto é, plasma, urina, e saliva). As estratégias analíticas empregadas podem, aproximadamente, serem sub-divididas em derivação baseada e métodos de rótulo livre. Particularmente, para a análise de matrizes biológicas, estas estratégias têm sido acopladas para a separação de técnicas, tais como a cromatografia líquida (LC) ou cromatografia gasosa (GC). Devido a sua elevada reatividade, a maioria do MDA presente pode ser vinculado à proteínas do plasma e outras espécies. Por isso, é importante enfatizar se o nível de MDA livre ou total é determinado. Referindo-se a este fato, é também essencial para escolher condições de preparação de amostras adequadas, particularmente condições de hidrólise, quando o MDA total deve ser analisado e para considerar a liberação e / ou formação de MDA quando duras condições de derivatização devem ser aplicadas. (GIERA; LINGEMAN; NIESSEN, 2012)

Todavia, no presente estudo, o ácido caurenóico promoveu a diminuição significativa da concentração do MDA decorridas 24/48h da confecção do retalho cutâneo randomizado em ratos em relação ao grupo controle, evidenciando ação antilipoperoxidativa (Tabela 04; Figuras 18 e 19).

Paiva *et al.*, (2003) utilizou o ácido caurenóico, um diterpeno da *Copaifera langsdorffii* Desf, em colite induzida por ácido acético, onde os ratos foram pré-tratados 02h antes, por via oral e 02h antes, por via retal, da indução da colite, com ácido caurenóico, nas doses de 50mg e 100mg/Kg, em um volume de 01ml. Todos os ratos foram sacrificados 24 horas depois e, ressecado 05 cm do colo distal, tendo sido dosados mieloperoxidase e malondialdeído. Os resultados obtidos foram:

Controle ácido acético 8.67 ± 0.33

Pré-tratamento por via retal:

AA+KA (50 mg/kg) 5.28 ± 0.92 (39%)
 AA+KA (100 mg/kg) $4.17 \pm 0.75^*$ (52%)
 Pré-tratamento por via oral
 AA+KA (50 mg/kg) 5.50 ± 0.67 (36%)
 AA+KA (100 mg/kg) $5.00 \pm 0.45^*$ (42%)

Nos grupos tratados com ácido caurenóico (50 e 100 mg / kg) os níveis de MDA raspados de mucosa do cólon foram significativamente menores e sem dependência da dose, em comparação com o controle de ácido acético, evidenciando atividade antioxidante e antilipoperoxidativa do ácido caurenóico. Apesar de não se tratar de um estudo que retrate a isquemia/reperfusão, mas, os resultados de atividade antilipoperoxidativa são análogos ao resultado do presente estudo.

Entretanto, o ácido caurenóico é um componente importante do óleo-resina de copaíba. Assim sendo, Silva et al., (2009) utilizaram o óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* Desf que contém o ácido caurenóico, estudando os seus efeitos em isquemia/reperfusão em retalhos de pele randomizados em ratos. Tendo sido o óleo-resina diluído em Tween 80, o estudo foi dividido em 04 grupos, a saber: grupo salina, grupo controle veículo, grupo teste 1 (200mg/Kg) e grupo teste 2 (400mg/Kg). O óleo-resina de *Copaifera* e drogas controle (salina e Tween 80) foram administradas por gavagem 24, 12, e 2 h antes do início do experimento, seguido por doses diárias, até durante 7 dias. Para observar os efeitos da *Copaifera*, análises laboratoriais incluindo o plasma e tecido, foram realizados, sendo dosados os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a glutathiona reduzida (GSH) e os níveis de mieloperoxidase (MPO) no tecido. A coleta do material aconteceu com 24h, 48h e 168h após a confecção do retalho de pele randomizado, com os seguintes resultados:

Concentrações de TBARS:

Grupo	T24	T48	T168
GCS	0.042 ± 0.027	0.028 ± 0.035	0.026 ± 0.015
GT400	$0.012 \pm 0.001^*$	0.010 ± 0.003	0.053 ± 0.014

Os autores concluíram que houve diminuição significativa na concentração de TBARS, com o grupo teste 2, mantendo, portanto, relação com o presente estudo,

onde o ácido caureóico poderia ser o responsável pelo efeito obtido com o óleo-resina de copaíba.

No presente estudo, não houve diminuição significativa do MDA no tempo 168 horas, com o uso do ácido caurenóico, mostrando que a atividade antilipoperoxidativa do mesmo, não se manteve no decorrer do tempo em estudo.(Tabela 04; Figura 20)

Não obstante, no presente estudo, a L-arginina promoveu diminuição significativa da concentração de MDA, decorridas 24h da construção do retalho cutâneo randomizado, em relação ao grupo controle, evidenciando atividade antilipoperoxidativa e antioxidante (Tabela 4; Figura 18-20). Nos tempos 48/168h, não houve diminuição significativa de MDA.

Kochar; Umathe (2009) estudaram os efeitos benéficos da L-arginina em estresse oxidativo induzido por diabetes, em tecidos gastrointestinais em ratos. O estudo foi dividido em dois grupos: diabéticos e não diabéticos. A Diabetes foi induzida por Aloxan (120mg/Kg). Todos os ratos foram tratados diariamente com L-arginina (0,5mg/ml) diluída em água. A concentração na água potável fornecida aos ratos diabéticos foi ajustada (0,15 mg / ml de L-arginina em média) para assegurar uma alimentação equivalente, porque o seu consumo de água foi de 3,5 vezes maior do que os ratos não diabéticos. Depois de receber os tratamentos durante 56 dias, os ratos foram sacrificados, sob anestesia profunda com éter no dia 57. O estômago e o intestino foram removidos para dosagem de MDA, GSH, SOD e atividade da catalase. O resultado obtido em relação ao MDA foi:

No estômago (piloro):

Grupo		MDA	GSH
Não diabético	Veículo	0.45 ± 0.04	0.29 ± 0.01
	L-arginina	0.43 ± 0.03	0.30 ± 0.01
Diabético	Veículo	0.66 ± 0.04	0.17 ± 0.01
	L-arginina	0.45 ± 0.06	0.26 ± 0.02

No intestino (íleo)

Grupo		MDA	GSH
Não diabético	Veículo	0.32 ± 0.02	0.20 ± 0.01
	L-arginina	0.30 ± 0.04	0.21 ± 0.01

Diabético	Veículo	0.58 ± 0.03	0.13 ± 0.01
	L-arginina	0.31 ± 0.04	0.22 ± 0.01

Os autores concluíram que a L-arginina melhorou significativamente o estresse oxidativo gastrointestinal, a partir da diminuição dos níveis de MDA . Esses resultados mantêm relação com os encontrados no estudo em questão, onde os efeitos da L-arginina podem ser atribuídas a sua capacidade oxidante direta NO-dependente e / ou através de caminhos independentes do NO.

Não obstante, a glutathiona ou tios não proteicos (GSH), possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. Este tripeptídeo é encontrado intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos. Nota-se a ligação γ -peptídica pouco usual, a presença da porção γ -glutamil e do grupo α -carboxilato livre, prevenindo a hidrólise da GSH pelas peptidases celulares que degradam outros peptídeos pequenos. A GSH é o mais abundante tiol celular de baixa massa molecular; a sua concentração é, aproximadamente, 2mM e mais de 10 mM em eritrócitos humanos e hepatócitos, respectivamente. Muitas das reações da GSH envolvem o grupo sulfidril (SH), altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos, também, faz da glutathiona um bom redutor. A combinação de sua abundância nos organismos aeróbicos e das propriedades químicas do grupo sulfidril suporta a proposta de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra espécies reativas de oxigênio e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente em que este vive. (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008)

A biossíntese da GSH ocorre no meio intracelular (exceto em células epiteliais), pela ação consecutiva de duas enzimas. Na primeira reação, é formada uma ligação peptídica entre os aminoácidos glutâmico e cisteína, catalisada pela enzima γ -glutamilcisteína sintetase, levando à γ -L-glutamil-L-cisteína. Este dipeptídeo é então ligado à glicina pela ação da glutathiona sintetase. Estas etapas requerem ATP e Mg²⁺. A γ -glutamilcisteína sintetase sofre regulação pela GSH através de um feedback negativo, o que previne a produção excessiva desta ou o acúmulo do intermediário γ -glutamilcisteína. Caso a conversão da γ -glutamilcisteína em GSH seja insuficiente, uma reação alternativa predomina: a conversão à 5-

oxoprolina, catalisada pela γ -glutamilciclotransferase. A produção excessiva de 5-oxoprolina ocorre em casos de deficiência hereditária da glutathione sintetase e é caracterizada por 5-oxoprolinúria, acidose metabólica crônica e distúrbios neurológicos. A biossíntese da GSH pode ser inibida pela butionina sulfoximina (BSO), um inibidor com estrutura similar a um intermediário ativado na reação catalisada pela γ -glutamilcisteína sintetase. Em sistemas experimentais, na supressão das concentrações intracelulares de GSH pela BSO, observa-se o aumento da sensibilidade das células à radiação ionizante e a certas drogas citostáticas. Essa sensibilização está sendo explorada para uso clínico na terapia contra câncer. A limitação desta técnica é que tanto células normais quanto as tumorais podem ser afetadas e os efeitos tóxicos nos tecidos normais podem ser mais importantes que o fato de tornar as células tumorais mais susceptíveis ao tratamento. (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008)

Entretanto, Para que a atividade protetora da glutathione expressa pela redução de espécies oxidantes, e conseqüente oxidação da GSH à glutathione dissulfeto (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através do ciclo catalítico. Nele podemos identificar a atividade de três grupos de enzimas: a glutathione oxidase (GO), a glutathione peroxidase (GSH-Px) e a glutathione redutase (GR). As duas primeiras enzimas, GO e GSH-Px, catalisam a oxidação de GSH à GSSG e a última, GR, é responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH. Dissulfetos são formados a partir de tióis de baixo peso molecular, polipeptídeos e proteínas. A glutathione é convertida em glutathione dissulfeto (GSSG) pela catálise da glutathione oxidase, uma enzima FAD-dependente, que oxida também outros aminotióis, como por exemplo, a L-cisteína. A denominação glutathione oxidada para GSSG não é específica, pois, dissulfetos mistos de glutathione (GSHR), ácidos sulfínico (GSOH) e S-sulfogluthione (GSSO₃H) e sulfônico (GSOH) e a própria glutathione dissulfeto são formas oxidadas de GSH. (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008)

Por conseguinte, um importante sistema enzimático de defesa contra radicais livres envolve as glutathiones peroxidases (GSH-Px) encontradas em muitos tecidos de origem animal. Estas enzimas são bastante particulares no que se refere a sua constituição, pois incorporam um resíduo de selenocisteína no seu sítio ativo. Selenocisteína é codificada pelo códon UGA, que é usualmente um terminador, e é incorporada por um RNA transportador específico. O envolvimento de algumas GSH-

Px no controle dos níveis de hidroperóxidos fosfolipídicos, formados a partir do ataque de espécies radicalares às membranas é bem estudado, assim como os parâmetros cinéticos da GSH-Px e o mecanismo catalítico envolvendo glutathione e peróxido de hidrogênio. (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008)

A enzima responsável pela redução da GSSG à GSH é a glutathione redutase. Os sítios ligantes para GSSG estão situados na interface das duas subunidades que constituem a estrutura quaternária da glutathione redutase, sendo que cada uma tem um domínio distinto com um sítio ligante para o NADPH. (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008)

As glutathione transferases (GSTs), também, conhecidas historicamente como glutathione S-transferases, compreendem uma família de enzimas multifuncionais que catalisam o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutathione (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico. As GSTs geralmente se encontram no meio biológico como homo ou heterodímeros (outros complexos também podem existir), apresentando dois sítios ativos por dímero cujas atividades são independentes uma da outra. Cada sítio ativo consiste no mínimo de duas regiões de ligação, um para a glutathione (GSH) que é muito específico para este tripeptídeo, e outro sítio de ligação com menor especificidade para os eletrófilos. Os substratos (eletrófilos) mais comuns das glutathione transferases incluem: haletos de alquila, epóxidos, compostos α,β insaturados (como quinonas, iminoquinonas, aldeídos, cetonas, lactonas e ésteres), haletos de arila e nitro aromáticos. (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008)

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($HO\cdot$), é consequência natural da respiração aeróbica. Estas espécies podem causar danos estruturais a muitas biomoléculas, como lipídeos de membrana, DNA, proteínas, carboidratos etc. Felizmente, a célula possui um sistema antioxidante que compreende as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, além de agentes oxidantes como α -tocoferol, ácido ascórbico, bilirrubina etc. A peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares resulta na formação de eletrófilos, como aldeídos e, hidroxialdeídos, cetoaldeídos- α,β -insaturados e/ou seus respectivos epóxidos. Alguns destes são altamente genotóxicos, e sua formação excessiva pode ser controlada pela ação de GSTs. De fato, foi demonstrado que GSTs promovem a adição conjugada da glutathione (GSH) à acroleína, crotonaldeído

e à outros aldeídos α,β -insaturados que possuem de 6 a 15 átomos de carbono. Outros exemplos da atuação de glutathion transferases na detoxificação de compostos endógenos incluem a ação de tais enzimas sobre epóxidos derivados do colesterol, do ácido eicosatrienóico e do ácido esteárico, de aldeídos α,β -insaturados derivados de nucleotídeos e quinonas derivadas da dopamina etc. (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008)

No entanto, métodos analíticos para quantificar GSH, ou seus precursores e metabólitos, em várias matrizes biológicas são de extrema importância e a literatura apresenta uma vasta coletânea destes métodos, que vêm sendo revistos. Ao selecionarmos um método analítico com este propósito, ele deve ser específico para diferenciar a GSH de outros tióis presentes nas células e em produtos de biotransformação, além de separar GSH e GSSG de moléculas interferentes, presentes em matrizes complexas, como por exemplo, sangue total e homogenato de fígado. Os métodos de análise dividem-se em cromatográficos e não cromatográficos, mas qualquer que seja ele, o pré-tratamento da amostra é fundamental, incluindo coleta e preparação da amostra, remoção de proteínas e a derivatização, dependendo da técnica selecionada. Em relação à preparação da amostra, o ponto mais crítico da análise da GSH é a sua auto-oxidação em pH aproximadamente 7, sendo recomendada a manipulação abaixo deste valor. Este procedimento também é importante para dificultar a proteólise em matrizes biológicas, catalisada pela γ -glutamyltransferase. Assim, as recomendações gerais são a manutenção do pH abaixo de 7, refrigeração e, quando a matriz é o plasma, a precipitação de proteínas por ácidos é também indicada. O uso de ultrassom não é recomendado, porque provoca hemólise, uma das principais causas de erro, geralmente na fase de coleta da amostra, uma vez que a concentração de GSH nas hemácias é muito alta; já a armazenagem à temperatura ambiente, favorece reações de auto-oxidação e proteólise, consumindo o substrato GSH e acarretando valores baixos de concentração. O uso de catéter para coleta do sangue e o recolhimento em tubos heparinizados contornam estes problemas. Inibidores da γ -glutamyltransferase e agentes quelantes como a 1,10-fenantrolina para capturar o íon ferroso, prevenindo reações de oxidação da GSH, também são utilizados. As proteínas presentes em amostras biológicas devem ser removidas antes da análise, através da precipitação com ácidos (5-sulfossalicílico, trifluoroacético, tricloroacético, perclórico, metafosfórico), ou por solventes orgânicos,

dos quais os mais usados são acetona, acetonitrila e metanol. Este último procedimento é o preferido quando a detecção é por espectrometria de massas. Uma outra técnica importante é a ultracentrifugação, que exclui macromoléculas com base nas dimensões dos poros dos filtros. (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008)

O estado redox das células, relacionado com a glutathione, desempenha um papel importante na regulação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral- α (TNF), interleucina (IL) -1 β e IL6, e a atividade de vias de sinalização intracelular. A glutathione tem efeitos antivirais e pode inibir a replicação de muitos vírus. A glutathione modula a função de células T e as células natural killer e regula os processos que permitam a proliferação celular, divisão, e a apoptose. A glutathione desempenha um papel na síntese, reparação, e expressão de DNA. A função e sobrevivência das mitocôndrias é dependente do sistema de glutathione. A glutathione tem funções importantes no cérebro, como um antioxidante e neuromodulador e promotor de sobrevivência neuronal. A glutathione atua como um neuromodulador dos receptores de glutamato ionotrópicos, interage com N-methylDAspartate (NMDA), e protege contra excitotoxicidade do glutamato. Essas funções-chaves explicam por que o esgotamento de glutathione pode ser acompanhada por disfunções em muitos órgãos e funções celulares que, estão associados com o aparecimento de distúrbios neuroimunes, incluindo depressão, encefalomielite miálgica / síndrome da fadiga crônica (ME / CFS), e Doença de Parkinson. (MORRIS *et al.*, 2014)

A investigação sobre o campo relacionado à produção de ROS/RNS durante os processos metabólicos, mesmo sob condições fisiológicas, desbloqueia um outro ramo da pesquisa, enfocando o papel da GSH, variando de varredura de radicais/antioxidante, para sinalização de modulador redox. A GSH limpa eficazmente os radicais livres e outros ROS e RNS (por exemplo, radical hidroxila, radical peróxido de lipídios, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) diretamente e indiretamente através de reações enzimáticas. A estrutura química da GSH determina suas funções, e sua ampla distribuição entre todos os organismos vivos reflete o seu papel biológico importante. Em particular, tem sido demonstrado que a unidade tiol da GSH é importante em sua função antioxidante na varredura direta das espécies de radicais. Com efeito, a redução do elétron um com os radicais não é quimicamente favorável, porque iria gerar os radicais GS instáveis. No entanto, a reação é cineticamente conduzida na direção de avanço pela remoção de GS

através das seguintes reações com o ânion tiolato (GS-) e, em seguida, com oxigênio. A primeira reação conduz à geração de GSSG, que na presença de S, gera GSSG, e de superóxido ($O\cdot 2^-$). Em última análise, as reações em cadeia de radicais serão bloqueadas pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), em associação com catalase ou GPX que determina a completa varredura dos radicais livres. De fato, demonstramos que GSH finalmente, compensa o declínio da atividade SOD1 em: (i) células com expressões mutante SOD1 menos ativo encontrado na esclerose lateral amiotrófica familiar; (ii) em células SOD1 que é regulada por interferência de RNA. Em particular, a rajada inicial de superóxido que, não pode ser eliminado eficientemente devido à inatividade de SOD1 é prontamente tamponada pela indução da síntese de GSH, resultando em proteção contra o estresse oxidativo e morte celular. Em outras mãos, a GSH não reage diretamente não enzimaticamente com hidroperóxidos. De fato, o seu papel como um co-substrato para o selênio-dependente GPX foi reconhecido como o mecanismo mais importante para a redução de H e hidroperóxidos de lípidos. Além disso, mais recentemente, uma família de proteínas chamadas peroxirredoxinas tem sido reconhecida como catalisando a redução de H_2O_2 por GSH e / ou outros tióis, mas com cisteína na sua forma tiolato, nos seus centros ativos em vez de selênio-cisteína. A GSH atua como um cofator no sistema de eliminação de metilglioxal, que consiste de duas enzimas chamadas glyoxalases. No entanto, outras funções de GSH incluem: (i) manter o estado essencial do tiol dos resíduos de cisteína nas proteínas; (ii) armazenagem das reservas de cisteína; (iii) o envolvimento no metabolismo de estrógenos, leucotrienos e prostaglandinas; (iv) a participação na produção de desoxirribonucleótidos; (v) a participação na maturação do conjunto do ferro-enxofre em proteínas; (vi) de transdução de sinal a partir do ambiente para maquinaria de transcrição celular. (AQUILANO; BALDELLI; CIRIOLO, 2014)

No presente estudo, o ácido caurenóico promoveu aumento significativo da concentração de tióis não protéicos (NPSH), decorridas 24/48/168h da construção do retalho cutâneo randomizado, evidenciando atividade antioxidante. Onde se observa que esta atividade antioxidante se manteve durante todo o período de estudo. (Tabela 5, Figuras 21-23).

Silva et al., (2009) utilizaram o óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* Desf que contém o ácido caurenóico, estudando os seus efeitos em isquemia/reperfusão em retalhos de pele randomizados em ratos. Tendo sido o óleo-resina diluído em Tween

80, o estudo foi dividido em 04 grupos, a saber: grupo salina, grupo controle veículo, grupo teste 1 (200mg/Kg) e grupo teste 2 (400mg/Kg). O óleo-resina de Copaifera e drogas controle (salina e Tween 80) foram administradas por gavagem 24, 12, e 2 h antes do início do experimento, seguido por doses diárias, até durante 7 dias. Para observar os efeitos da Copaifera, análises laboratoriais incluindo o plasma e tecido, foram realizados, sendo dosados os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a glutathiona reduzida (GSH) e os níveis de mieloperoxidase (MPO) no tecido. A coleta do material aconteceu com 24h, 48h e 168h após a confecção do retalho de pele randomizado, com os seguintes resultados:

Concentrações de GSH:

Grupo	T24	T48	T168
GCS	3.780 ± 0.89	3.120 ± 0.49	6.050 ± 1.19
GT200	22.60 ± 2.14	25.60 ± 1.02*	26.60 ± 5.09

Assim, os autores concluíram que o óleo-resina de Copaíba apresenta intensa ação antioxidante durante a isquemia e reperfusão de retalhos cutâneos randomizados em ratos. Esse experimento mantém relação com o estudo em questão, pois, sendo o ácido caurenico um componente importante do óleo-resina de copaíba, essa atividade antioxidante poderia ter sido efeito do mesmo.

Todavia, a L-arginina promoveu aumento significativo da concentração de tiois não protéicos (NPSH), decorridas 24/48h da construção do retalho cutâneo randomizado, evidenciando, assim, atividade antioxidante. Não foram observadas diferenças significantes após 168h da construção do retalho cutâneo randomizado, mostrando que a atividade antioxidante não se manteve durante todo o período de estudo (Tabela 5, Figuras 21-23).

Kochar; Umathe (2009) estudaram os efeitos benéficos da L-arginina em estresse oxidativo induzido por diabetes, em tecidos gastrointestinais em ratos. O estudo foi dividido em dois grupos: diabéticos e não diabéticos. O diabetes foi induzido por Aloxan (120mg/Kg). Todos os ratos foram tratados diariamente com L-arginina (0,5mg/ml) diluída em água. A concentração na água potável fornecida aos ratos diabéticos foi ajustada (0,15 mg / ml de L-arginina em média) para assegurar uma alimentação equivalente, porque o seu consumo de água foi de 3,5 vezes maior do que os ratos não diabéticos. Depois de receber os tratamentos durante 56 dias, os ratos foram sacrificados, sob anestesia profunda com éter, no dia 57. O

estômago e o intestino foram removidos para dosagem de MDA, GSH, SOD e atividade da catalase.

Os resultados encontrados foram os seguintes:

Grupo		GSH
Não diabético	Veículo	0.29 ± 0.01
	L-arginina	0.30 ± 0.01
Diabético	Veículo	0.17 ± 0.01
	L-arginina	0.26 ± 0.02

No intestino (íleo)

Grupo		GSH
Não diabético	Veículo	0.20 ± 0.01
	L-arginina	0.21 ± 0.01
Diabético	Veículo	0.13 ± 0.01
	L-arginina	0.22 ± 0.01

Os autores concluíram que a L-arginina melhorou significativamente o estresse oxidativo gastrointestinal, a partir do aumento dos níveis de GSH endógeno. Além disso, o estudo suporta os efeitos benéficos da L-arginina. Estes efeitos podem ser atribuídas a sua capacidade oxidante direta NO-dependente e / ou através de caminhos independentes do NO. Esse experimento mantém relação com o estudo em questão, por se tratar de uma condição de estresse oxidativo e pelos resultados mostrarem, também, atividade antioxidante da L-arginina.

Entretanto, A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima derivada de leucócitos que catalisa a formação de numerosas espécies reativas oxidantes. Além de integrantes da resposta imune inata, evidências têm comprovado a contribuição desses oxidantes para o dano tecidual durante inflamação. A MPO participa de atividades biológicas pró-aterogênicas relacionadas à evolução da doença cardiovascular, incluindo iniciação, propagação e as fases de complicação aguda do processo aterosclerótico. A síntese de MPO ocorre durante a diferenciação mielóide na medula óssea e está completa dentro dos granulócitos previamente à sua entrada na circulação. Essa enzima é encontrada predominantemente em neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais. Representa mais de 5% do conteúdo protéico total da célula em neutrófilos e 1% nos monócitos. (ROMAN; WENDLAND; POLANCZYK, 2007)

A MPO é uma proteína catiônica, com peso molecular de 144 kD, que consiste em dois dímeros idênticos ligados por uma ponte de bissulfeto, sendo cada dímero composto de uma subunidade de cadeia leve e uma pesada, com grupos heme funcionalmente idênticos. É o principal constituinte dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, prontamente liberada após ativação por diferentes agonistas, contribuindo para a defesa imune inata do organismo. Crescentes evidências demonstram o papel da MPO como participante central do elo entre inflamação e doença cardiovascular. A mieloperoxidase, pela reação com peróxido de hidrogênio, forma radicais livres e substâncias oxidantes difusíveis com atividade antimicrobiana, mas também promove dano oxidativo do tecido do hospedeiro, por exercer efeitos pleiotrópicos na vasculatura com potencial impacto no desenvolvimento de aterosclerose, disfunção endotelial, instabilidade de placa e resposta no remodelamento ventricular após injúria isquêmica. (ROMAN; WENDLAND; POLANCZYK, 2007)

Estudos recentes apontam os prováveis mecanismos pelos quais a mieloperoxidase é capaz de promover oxidação de lipoproteínas in vivo. Macrófagos utilizam NADPH oxidase para produzir superóxido (O_2^-) que pode dismutar e formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A MPO catalisa reações com H_2O_2 para gerar oxidantes citotóxicos mais potentes como HOCl (ácido hipocloroso) e radical tirosil, sendo a única enzima humana capaz de gerar HOCl. A MPO tem a habilidade de modificar oxidativamente o aminoácido tirosina da apolipoproteína B-100 (apo B-100), usando H_2O_2 e íon Cl^- para gerar 3-clorotirosina. Pode, também, nitratar a tirosina, oxidando nitrito (NO_2^-), produto final do metabolismo do óxido nítrico (NO), gerando 3-nitrosina. Além de marcadores da atividade da MPO, a 3-clorotirosina e 3-nitrotirosina têm importância clínica por promover dano oxidativo. (ROMAN; WENDLAND; POLANCZYK, 2007)

Quando os neutrófilos encontram micróbios opsonizados, ingerem-nos em fagossomos, passam por uma explosão de consumo de oxigênio, e libertam proteínas a partir de grânulos no espaço fagossomal. A MPO representa 5% da proteína total de neutrófilos e é um dos principais constituintes dos grânulos. A enzima responsável pelo consumo de oxigênio é um complexo NADPH oxidase. Reúne principalmente na membrana fagossomal e canais de elétrons de NADPH no

citoplasma através da membrana de oxigênio, gerando ânions superóxido no fagossomo. Como esta transferência de elétrons cria um desequilíbrio de carga que, caso contrário, despolariza a membrana, a atividade da NADPH-oxidase é acompanhada por ativação de um próton por voltagem do canal. O superóxido sofre dismutação, uma reação que mantém o pH próximo da neutralidade intrafagossomal, e produz H₂O₂. A MPO oxida cloretos e outros halogenetos (brometo, iodeto, e o pseudohalogeneto tiocianato) para gerar os respectivos ácidos. Estudos cinéticos mostraram que o cloreto e o tiocianato são os mais favorecidos. A reação envolve a oxidação de dois elétrons do halogeneto por composto I, com uma reação líquida de: $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + OH^-$. (KLEBANOFF et al., 2013)

Produtos derivados da MPO afetam aspectos da resposta inflamatória, além da oxidação e morte de micróbios no fagossomo. MPO extracelular pode modificar mediadores inflamatórios; por exemplo, HOCL derivados da MPO podem regular eventos proteolíticos, nos locais de inflamação aguda, ativando proteases, tais como metaloproteínases de matriz e, inativando inibidores de proteases. Como consequência destas reações, a MPO pode criar um ambiente proteolítico aprimorado que, contribui para a liquefação, necrose e formação de abscesso. (KLEBANOFF et al., 2013)

Nos últimos anos a MPO ganhou muita atenção e, um número de estudos pioneiros demonstraram que, exceto pela compreensão de um componente crucial do processo de fagocitose, a MPO teve um único perfil de efeitos pleiotrópicos. Um amplo espectro de ações da MPO em saúde e doença humanas foram reconhecidas e diretamente relacionadas aos oxidantes derivados da MPO (eminentemente, ácido hipocloroso), com numerosas funções celulares, contribuindo para a lesão tecidual. Exemplos de tais efeitos, são as correlações de MPO com várias formas de câncer, doenças neurodegenerativas, tais como, Alzheimer, esclerose múltipla e doença de Parkinson, doença periodontal, hepatite C, com fibrose induzida por vírus, vasculites, doença renal, tal como, por imunocomplexo e glomerulonefrite membranosa, nefropatia diabética e lesão por isquemia/reperfusão, doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide e doença intestinal inflamatória, doenças do pulmão, como DPOC, lesão induzida por asbestos e fibrose cística. No entanto, um dos e talvez o mais importante, o efeito mais proeminente da MPO na fisiopatologia

da doença, é na geração e propagação de uma série de doenças cardiovasculares. (ANATOLIOTAKIS et al., 2013)

No presente estudo, o ácido caurenóico promoveu diminuição significativa da atividade de MPO, decorridas 24h/48h da construção do retalho cutâneo randomizado, em relação ao grupo controle, evidenciando atividade anti-inflamatória. Não foram observadas diferenças significantes após 168h da construção do retalho cutâneo randomizado, mostrando que a ação anti-inflamatória não se mantém durante todo o período estudado. (Tabela 6, Figuras 24-26).

Entretanto, O fator 2 relacionado ao fator eritróide nuclear (Nrf2) é um fator de transcrição chave que regula a expressão de genes que estão envolvidos em detoxificação de drogas e produtos químicos. Normalmente, Nrf2 reside no citoplasma em baixa abundância. Quando ativado, aumenta em abundância e se transloca para o núcleo, onde se liga ao seu elemento de resposta antioxidante de ação-cis, resultando na expressão de vários genes de detoxificação fase 2, tal como a subunidade catalítica ligase de glutamato-cisteína, NAD (P) H: oxidoreductase1 quinina (NQO1), e hemeoxigenase-1 (HO-1). Além disso, Nrf2 parece ter um papel importante na melhora da inflamação. A ablação genética de nrf2 agrava a inflamação em várias doenças inflamatórias em modelos animais, incluindo a inflamação pulmonar aguda, o enfisema induzido por fumaça e asma. (LYU et al., 2011)

Estudo mostra que o ácido caurenóico é um potente ativador de Nrf2. LYU et al., 2011 sugeriu que a atividade anti-inflamatória do ácido caurenóico é atribuível a supressão de NF-kB (Fator Nuclear k-B), um fator-chave de transcrição que regula a inflamação, e da expressão de NF-kB genes dependentes. O efeito inibitório do NF-kB pelo ácido caurenóico é exercido através da modificação covalente do IKK, pela adição de um nucleofílico, com os resíduos da cisteína da quinase. (Tendo em vista que o estresse oxidativo e a inflamação estão relacionados com certos tipo de câncer, o Nrf2 tem sido considerado como um fator promissor para o tratamento do câncer. Tendo em visto os vários papéis do Nrf2 em fisiopatologia, é possível que o ácido caurenóico poderia ser um excelente componente natural para o tratamento de doenças inflamatórias e certos cânceres, embora, o papel do Nrf2 em câncer seja controverso e, o seu efeito possa depender do tipo de câncer. (LYU et al., 2011)

Embora, um crescente corpo de evidências supõe a ação anti-inflamatória do Nrf2, ainda não está muito claro como o Nrf2 controla as respostas inflamatórias. Um dos mecanismos possíveis é que, Nrf2 suprime diretamente a expressão dos genes

proinflamatórios, interferindo com os fatores chaves de transcrição, tais como, NF- κ B e AP-1. A inflamação é frequentemente associada com o estresse oxidativo, causado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). É bem documentado que ROS é um potente ativador de Nrf2 e, ativado Nrf2 induz a produção de proteínas, tais como, NQO-1 e GCLC que, produz a varredura de ROS. (LYU *et al.*, 2011)

Paiva *et al.*,(2003) utilizou o ácido caurenóico, um diterpeno da *Copaifera langsdorffii* Desf, em colite induzida por ácido acético, onde os ratos foram pré-tratados 02h antes, por via oral e 02h antes, por via retal, da indução da colite, com ácido caurenóico, nas doses de 50mg e 100mg/Kg, em um volume de 01ml. Todos os ratos foram sacrificados 24 horas depois e, ressecado 05 cm do colo distal, tendo sido dosados mieloperoxidase e malondialdeído. Os resultados obtidos foram:

Controle ácido acético 8.67 ± 0.33

Pré-tratamento por via retal:

AA+KA (50 mg/kg) 5.28 ± 0.92 (39%)

AA+KA (100 mg/kg) $4.17 \pm 0.75^*$ (52%)

Pré-tratamento por via oral

AA+KA (50 mg/kg) 5.50 ± 0.67 (36%)

AA+KA (100 mg/kg) $5.00 \pm 0.45^*$ (42%)

Nos grupos tratados com ácido caurenóico (50 e 100 mg / kg), a atividade de MPO retal ou oral) foram significativamente menores e sem dependência da dose, em comparação com o controle de ácido acético, evidenciando atividade anti-inflamatória do ácido caurenóico. Assim, os autores concluíram que os efeitos anti-inflamatórios do grupo kaurene de diterpenos foram descritos e eles parecem prejudicar a sinalização inflamatória, através da inibição de fatores nucleares como NF- κ B. Assim sendo, presume-se que o ácido caurenóico inibe a atividade da NF- κ B que regula a transcrição de diversas citocinas inflamatórias. Esse experimento, apesar de não se tratar de isquemia/reperfusão, mantém correlação com o presente estudo, pela constatação de atividade anti-inflamatória do ácido caurenóico.

Silva *et al.*, (2009) utilizaram o óleo-resina de *Copaifera langsdorffii* Desf que contém o ácido caurenóico, estudando os seus efeitos em isquemia/reperfusão em retalhos de pele randomizados em ratos. Tendo sido o óleo-resina diluído em Tween 80, o estudo foi dividido em 04 grupos, a saber: grupo salina, grupo controle veículo,

grupo teste 1 (200mg/Kg) e grupo teste 2 (400mg/Kg). O óleo-resina de Copaifera e drogas controle (salina e Tween 80) foram administradas por gavagem 24, 12, e 2 h antes do início do experimento, seguido por doses diárias, até durante 7 dias. Para observar os efeitos da Copaifera, análises laboratoriais incluindo o plasma e tecido, foram realizados, sendo dosados os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a glutatona reduzida (GSH) e os níveis de mieloperoxidase (MPO) no tecido. A coleta do material aconteceu com 24h, 48h e 168h após a confecção do retalho de pele randomizado, com os seguintes resultados da mieloperoxidase:

Concentrações de MPO:

Grupo	T24	T48	T168
GCS	0.70 ± 0.23	0.71 ± 0.10	4.17 ± 1.06*
GT200	0.13 ± 0.05	0.34 ± 0.34	1.15 ± 0.03**

Assim, os autores concluíram que o óleo-resina de Copaíba apresenta atividade anti-inflamatória durante a isquemia e reperfusão de retalhos cutâneos randomizados em ratos, mantendo uma correlação com o presente estudo.

No presente estudo, não houve alteração significativa da MPO ocasionada pela L-arginina. (Tabela 6, Figuras 24-26).

Não obstante, Nitrito (NO₂-) e nitrato (NO₃-), o que se pensava ser um material inerte do produto final do metabolismo oxidativo do óxido nítrico (NO), é agora visto como um reservatório da atividade do NO. Ambos dietética e fontes endógenas contribuem para as lojas do corpo destes ânions, com a fonte endógena central o caminho L-arginina-NO, onde o NO é rapidamente oxidado em nitrito e nitrato. O NO reage com a ceruloplasmina do plasma e o oxigênio, para formar o nitrito e a oxihemoglobina em células vermelhas do sangue para formar nitrato. Acima de 90% das fontes alimentares de nitrato são encontrados principalmente em folhas verdes e raízes de vegetais. O nitrito da dieta é encontrado principalmente na forma de um aditivo alimentar e conservante em carne para primariamente inibir o crescimento de *Clostridium botulinum*. Além disso, nitrito melhora a cor e o sabor de carnes cozidas. Investigação ao longo da última década demonstra que a formação do NO pode ocorrer independentemente da via NOS, através da redução de nitrato em nitrito e, da redução do nitrito a NO. Existem duas vias principais em mamíferos, onde ocorre a redução de nitrato para nitrito. Em primeiro lugar, bactérias gram-negativas comensais, presentes na cavidade oral e no trato gastrointestinal reduzem

o nitrato salivar. Quase um quarto de nitrato ingerido é ativamente secretado na saliva, e aproximadamente um quinto é reduzido a nitrito, por bactérias comensais. Além disso, há várias enzimas de mamíferos recém-descobertos com atividade redutora de nitrato, uma função anteriormente que só se pensava ser possuída por bactérias. Xantina oxidorreductase, aldeído oxidase, proteínas heme, e mitocôndrias têm demonstrado essa habilidade em mamíferos. (ALEF; TZENG; ZUCKERBRAUN, 2012)

A redução do nitrito a óxido nítrico ocorre tanto no sangue e tecidos através de uma variedade de vias enzimáticas e não enzimáticas. A conversão não enzimática ocorre via redução ácida. A redução enzimática de nitrito para o NO tem sido atribuída a uma série de enzimas, incluindo a deoxihemoglobina e desoximioglobina, xantina oxidorreductase, aldeído oxidase, e citocromo c oxidase. Além disso, a redução do nitrito a NO dentro dos tecidos é aumentada na definição de isquemia e hipoxia, circunstâncias em que a via clássica arginina/ NOS / NO via pode ser limitada. Assim, a via de nitrato-nitrito-NO poderia ser visto como uma via complementar, que se torna cada vez mais importante como na diminuição das tensões de oxigênio. (ALEF; TZENG; ZUCKERBRAUN, 2012)

O potencial terapêutico da via de nitrato-nitrito-NO está apenas começando a ser apreciado e investigado. Os efeitos vasodilatadores do nitrito foram demonstrados em vários estudos e em modelos animais, incluindo ratos, ovelhas, cães, primatas e seres humanos. A capacidade do nitrito em vasodilatação isquêmica nos leitos vasculares demonstra grande potencial em estudos pré-clínicos. Nitratos orgânicos, como a nitroglicerina, também, funcionam via vasodilatação. No entanto, é preciso diferenciar entre estes nitratos orgânicos com o íon nitrito inorgânico. Nitratos orgânicos demonstraram vasoatividade mais potente e são metabolizados in vivo em NO e nitrito. No entanto, este requer bioativação por metabolismo mitocondrial aldeído desidrogenase e outras enzimas que estejam sujeitas à tolerância induzida. Tal tolerância é caracterizada pela diminuição da atividade biológica da nitroglicerina, com a exposição crônica às drogas. (ALEF; TZENG; ZUCKERBRAUN, 2012)

No presente estudo, houve diminuição significativa da relação nitrito/nitrato em todos os grupos estudados, após 24h da construção do retalho cutâneo. Houve aumento significativo da relação nitrito/nitrato após 168h no grupo GA (Tabela 7, Figuras 27-29). Isto mostra que o ácido caurenóico e a L-arginina, nas primeiras

24h após a confecção do retalho cutâneo randomizado, apresentaram atividade antioxidante, não se mantendo durante todo o período do estudo. Entretanto, no tempo 168h, a L-arginina apresenta atividade pró-oxidante.

Não obstante, quando comparado a sua redução, a oxidação do nitrito e seu potencial papel na fisiologia e patologia dos mamíferos tem sido negligenciado. Embora, não dedicada aos mamíferos, a nitrito oxidase foi, ainda, descrita e várias proteínas heme parecem ter sido usadas para executar a função oxidase. Estas proteínas catalisam a oxidação do nitrito, não somente para o nitrato (oxidação de dois elétrons), mas, também, para o radical dióxido de nitrogênio (reação de um elétron). Além disso, o nitrito pode, também, ser oxidado por várias peroxidases, mieloperoxidase, lactoperoxidase, peroxidase eosinofílica, e, catalase; bem como, por oxidantes inflamatórios, tais como o ácido hipocloroso. Ao contrário do nitrato, o dióxido de nitrogênio é um poderoso oxidante e um agente nitrante que pode nitrar, não somente resíduos de proteínas, mas também, ácidos graxos e nucleotídeos de guanina. Ainda assim, enquanto a nitração limitada de ácidos graxos e de nucleotídeos de guanina foram mostradas para extrair respostas protetoras contra lesões inflamatórias em tecidos, a nitração das proteínas é considerada como sendo um processo deletério que, altera a função protéica e torna alvo para degradação. Além disso, as reações de nitração foram evocadas para explicar a perda de proteção observada, quando altas doses de nitrito foram administradas em condições de isquemia/reperfusão. (MAIA; MOURA, 2014)

Atualmente, a atividade como-peroxidase de mioglobina e hemoglobina, há muito tem sido conhecida; isso resulta na formação de radicais ferril e ferril-heme. Esta oxidação das proteínas, em uma situação de estresse oxidativo, poderia amplificar grandemente a oxidação do nitrito para dióxido de nitrogênio, e assim, promover a nitração proteica deletérica, observada, por exemplo, durante a lesão por isquemia/reperfusão do miocárdio. A presença de proteínas nitradas em eritrócitos circulantes é controversa. Por outro lado, as condições ácidas, característica de isquemia, favorecem as reações de nitração e diminuem a taxa de eliminação do dióxido de nitrogênio por tióis, por conseguinte, aumentando efetivamente a eficácia de nitração de proteínas. (MAIA; MOURA, 2014)

Em suma, no presente, é amplamente aceito que a oxidação do nitrito mediada pelas peroxidases, contribui para a nitração deletéria, observada em várias

afecções, de modo particular em condições inflamatórias. O mecanismo de oxidação do nitrito como-peroxidase pode ser generalizado, antecipando que outras proteínas heme, com atividade como-peroxidase, podem, também, promover a formação de radical dióxido de nitrogênio, contribuindo para a lesão oxidativa celular. (MAIA; MOURA, 2014)

Finalmente, pode ser afirmado que, a lesão causada pela isquemia-reperfusão é complexa, havendo necessidade da utilização de substâncias capazes de aumentar a resistência dos tecidos a esse fenômeno, diminuindo a produção e neutralizando a ação dos radicais livres. As substâncias utilizadas no presente experimento necessitam de estudos adicionais, com o intuito de definir sua aplicação em seres humanos e, com isso, diminuir a necrose dos retalhos cutâneos, efeito sobremaneira almejado pela cirurgia plástica.

6 CONCLUSÃO

O ácido caurenóico apresenta ação antilipoperoxidativa, intensa ação antioxidante e atividade anti-inflamatória; enquanto a L-arginina apresenta ação antilipoperoxidativa e antioxidante, durante a isquemia e reperfusão de retalho cutâneo randomizado em dorso de ratos.

REFERÊNCIAS

- ABLA, L.E.F.; GOMES, H.C.; PERCARIO, S.; FERREIRA, L.M. Acetilcisteína em retalho cutâneo randômico em ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 20, n. 2, p.121-123, 2005.
- ACEVEDO-BOGADO, C. E.; BINS-ELY, J.; D'ACAMPORA, A. J.; NEVES, R. E. Efeito da hialuronidase na sobrevida de retalhos cutâneos em ratas. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.17, supl.1, p.14-16, 2002.
- ALEF, M.J.; TZENG, E.; ZUCKERBRAUN, B.S. Nitric oxide and nitrite-based therapeutic opportunities in intimal hyperplasia. **Nitric Oxide**, v.26, p.285–294, 2012.
- ALMEIDA, K.G.; FAGUNDES, D.J.; MANNA, M.C.B.; SOUZA, E.F. Ação do dimetil-sulfóxido na isquemia de retalhos randômicos de pele em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v.19, n. 6, p. 649-657, 2004.
- ALVES, M. A.; GUIMARÃES, S. B.; DIAS, D. A.; VASCONCELOS, P. R. C. de; VASCONCELOS, P. R. L. de. Efeitos da L-alanil-glutamina sobre os parâmetros bioquímicos do sangue e do rim no rato submetido à isquemia/reperfusão do membro pélvico. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 6, p. 445-449, 2005.
- ALVES, T.M.A.; CHAVES, P.P.G.; SANTOS, L.M.S.T.; NAGEM, T.J.; MURTA, S.M.F.; CERAVOLO, I.P.; ROMANHA, A.J.; ZANI, C.L. A diterpene from Mikania obtusata active on Trypanosoma cruzi. **Planta Méd.**, v.61, n.1, p.85-86, 1995.
- ALVES, W. F.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. C. de; VASCONCELOS, P. R. L. de. Repercussões da L-alanil-glutamina sobre as concentrações de lactato e lactato desidrogenase (LDH) em pacientes com isquemia crítica dos membros inferiores submetidos a revascularização distal. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 3, p. 209-215, 2003.
- AMBROSIO SR, TIRAPELLI CR, COUTINHO ST, DE OLIVEIRA DC, DE OLIVEIRA AM, DA COSTA FB. Role of the carboxylic group in the antispasmodic and vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid. **J Pharm Pharmacol**. v.56, n.11, p.1407-13, nov, 2004.
- ANATOLIOTAKIS, N. Myeloperoxidase: Expressing Inflammation and Oxidative Stress in Cardiovascular Disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, p.115-138, 2013.
- ANDRADE JÚNIOR, D. A. de; SOUZA, R. B. de; SANTOS, S. A. dos. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **J. Bras. Pneumol.**, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.
- ANDREIA, C. M.; SILVA, B.A.; ORTIZ, V.; SILVA, R. A. da; TOGNINI, J. R. Efeito do alopurinol sobre a morfologia do testículo do rato submetido a isquemia, pela torção do cordão espermático seguida de reperfusão. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 6, 2005.

AQUILANO, K.; BALDELLI, S.; CIRIOLO, M.R. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. **Frontiers in Pharmacology/Experimental Pharmacology and Drug Discovery**, v. 5, n. 196, p.01-12, Aug. 2014.

ARAÚJO JÚNIOR, F.A.; BRAZ, M.N. ROCHA NETO, O.G.; COSTA, F. A; BRITO, M.V.H. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 93-99, 2005.

ATABEY, A.; GALDINO, G.; EL-SHAHAT, A.; RAMIREZ, O.M. The effects of tumescent solutions containing lidocaine and epinephrine on skin flap survival in rats. **Ann. Plast. Surg.**, v. 53, n. 1, p. 70-72, July 2004.

AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p.1-31. May. 2014.

AYDOGAN, H.; GURLEK, A.; PARLAKPINAR, H.; ASKAR, I.; BAY-KARABULUT, A.; AYDOGAN, N.; FARIZ, A.; ACET, A. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the ischaemia-reperfusion injury in rat skin flaps. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v. 60, n.5, p. 563-568, 2007.

BANKS, H. Structure of pollen apertures in the detarieaceae *sensu stricto* (*Leguminosae caesalpinioideae*), with particular reference to underlying Structure (Zwischenkorper). **Ann. Botany**, v. 92, p. 425-435, 2003.

BARBUL, A. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. **Surgery**, v.108, p.331-37, 1990.

BARBUL, A. Biochemistry, physiology and therapeutic implications. **J Parenter Enteral Nutr.**, v.10, p.227-38, 1986.

BARBUL, A. Metabolic and immune effects of arginine in post-injury hyperalimentation. **J Trauma**, v.21, p.970-4, 1981.

BARBUL, A.; RETTURA, G.; LEVENSON, S. M.; SEIFER, E. Arginine: a thymotropic and wound-healing promoting agent. **Surgical Forum**, v. 28, p.101-03, 1977.

BARBUL, A.; WASSERKRUG, H.; RETTURA, G.; LEVENSON, S. M.; EFRON, G. Immunoestimulatory effects of arginine in normal and injured rats. **J Surg Res**, v. 29, p. 228-35, 1980.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASILE, A. C.; SERTIE, J. A. A.; FREITAS, P. C. D.; ZANINI, A. C. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *copaifera*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 22, n. 1, p. 101-109, Jan. 1988.

BATISTA, R.; CHIARI, E.; DE OLIVEIRA, A.B.; Trypanosomicidal kaurene diterpenes from *Widelia paludosa*. **Planta Med.**, v.65, p.283-284, 1999.

BATISTA, R.; GARCÍA, P.A.; FELICIANO, A.S.; CASTRO, M.A.; CORRAL, J.M.M.; OLIVEIRA, A.B. New Oxidized ent-Kaurane and ent-Norkaurane Derivatives from Kaurenoic Acid. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 3, p. 622-627, 2007.

BEHESHTIAN, A.; DEMEHRI, S.; KIUMEHR, S. ATP-sensitive Potassium channels mediate the anti-ischemic properties of ischemic and pharmacologic preconditioning in rat random-pattern skin flap. **Ann. Plast. Surg.**, v. 57, n. 1, July 2006.

BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; GRECA, F.H.; PAULA, J.B. *et al.* Influência do Buflomedil em retalhos cutâneos isquêmicos - estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.15, supl. 3, 2000.

BITTENCOURT, R.C.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; PAULA, J.B.; CHIN, E.; SANTOS, E.A.A.; STALHSCHMIDT, F.L. Influência do minoxidil sobre retalhos cutâneos isquêmicos em ratos. **Acta Cir. Brás.**, v. 20, n. 6, p. 36-40, 2005.

BOAKYE-YIADOM, K.; FIAGBE, N.I.; AYMIN, J.S. Anti-microbial properties of some west African medicinal plants iv. Anti-microbial activity of xilopic acid and other constituents of the fruits of *Xylopiya aethiopyca* (Annonaceae). **Llyodia**, v.40, p.543-545, 1977.

BÖGER, R.H. The Pharmacodynamics of L-Arginine. **Alternative Therapies**, v.20, n.3, May-Jun., 2014.

BRADLEY, P.P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v.60, p.618-622, 1982.

BRESCIANI, L.F.; YUNES, R.A.; BURGER, C.; OLIVEIRA, L.E.; BOF, K.L.; CECHINEL-FILHO, V. Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). **Z Naturforsch [C]**, v.59, n.3-4, p.229-232, Mar-Apr. 2004.

BRITO, M. V. H.; ARAÚJO, M. de; ACÁCIO, G. J. S. REIS, J.M.C.DOS. Lesão intestinal após isquemia-reperfusão: estudo comparativo usando sal tetrazólico (mtt) e histologia. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 16, n. 1, jan./mar. 2001.

BRITO, M. V. H.; OLIVEIRA, R. V. B. de; SILVEIRA, E. L. Aspectos microscópicos do fígado de ratos após administração do óleo de copaíba. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.15, n. 2, abr./jun. 2000.

BRITO, M. V. R.; MOREIRA, R. de J.; TAVARES, M.L.C.; CARBALLO, M.C.S.; CARNEIRO, T.X.; SANTOS, A. DE A.S. Efeito do óleo de copaíba nos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos submetidos à síndrome de isquemia e reperfusão renal. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 3, p. 243-246, 2005.

BRITO, N.M.B.; KULAY-JÚNIOR, L.; SIMÕES, M.J.; LAMEIRA, O.A.; LAMARÃO, L.G.; DAMOUS, S.H.B. Aspectos morfológicos e morfométricos do colo uterino de ratas ooforectomizadas após aplicação de óleo de copaíba. **RBGO**, v. 22, n. 8, p.489, 2000.

BUSSOLATI, B.; AHMED, A.; PEMBERTON, H. LANDIS, R.C.; DICARLO, F.; HASKARD, D.O.; MASON, J.C. Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration. **Blood**, v. 103, n. 3, p. 761-766, Feb. 2004.

CAMPOS, H.; FERREIRA, L.M.; SANTOS, W.L.C.; ARAÚJO, M.C.M. Efeitos da nicotina nos retalhos cutâneos em ratos. **Acta Cir. Bras**, São Paulo, v.16, n.4, out./dez. 2001.

CARVALHO, D.; FERREIRA, R.A; OLIVEIRA, L.M. OLIVEIRA, A.F.; GEMAQUE, R.C.R.. Eletroforese de Proteínas e isoenzimas em semenetes de *Copaifera langsdorffii* desf. (*Leguminosae caesalpinioideae*) envelhecidas artificialmente. **Rev. Árvore**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 19-24, jan./fev. 2006

CARVALHO, E.N.; FERREIRA, L.M.; CARVALHO, N.A.S.; ABLA, L.E.F.; LIEBANO, R.E. Viabilidade do retalho cutâneo randômico dorsal em ratos diabéticos. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 3, p. 225-228, 2005.

CAVALCANTI, B.C. *et al.* Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44 p. 388–392, 2006.

CAVALCANTI, B.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BURBANO, R.R.; SILVEIRA, E.R., CUNHA, K.M.A.; RAO, V.S.N.; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food Chem. Toxicol.**, v.44, p.388-392, 2006.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

CESAR, G. **Curiosidades da nossa flora**. Recife: Imprensa Oficial, 1956.

CHAVAN, M.J.; KOLHE, D.R.; WAKTE, P.S.; SHINDE, D.B. Analgesic and Antiinflammatory Activity of Kaur-16-en-19-oic acid from *Annona reticulata* L. Bark. **Phytotherapy Research.**, v.26, n.2, p.273-276, February 2012.

COHEN I. K.; MOORE C. K., **Diogelmann RF. Onset and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum Press, 1988.

COHEN, K. **Wound care and wound healing**. In: SCHWARTZ, S.I. Principles of surgery. 7.ed. New York: McGRAW-HILL, 1999. 1296p. Cap. 8, p.263-95.

COSKUNFIRAT, O. K.; OZKAN, O.; DIKICI, M. B. The effect of ischemic preconditioning on secondary ischemia in skin flaps. **Ann. Plast. Surg.**, v. 57, n. 4, p. 431-434, Oct. 2006.

COSTA-LOTUFO, L.V. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231–1234, 2002.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G. M. A.; FARIAS, P. A. M.; VIANA, G. S. B.; CUNHA, K. M. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V.; RAO, V. S. N. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, p. 1231-1234, 2002.

COTORAS, M.; FOLCH, C.; MENDOZA, L. Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3beta-hydroxy-kaurenoic acid. **J. Agri. Food Chem.**, v.52, p.2821-2826, 2004.

- CUNHA, K.M.A.; PAIVA, L.A.; SANTOS, F.A.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S. Smooth muscle relaxant effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on rat uterus in vitro. **Phytother. Res.**, v.17, p.320-324, 2003.
- CYMROT, M.; PERCÁRIO, S.; FERREIRA, L.M. Comportamento do estresse oxidativo e da capacidade antioxidante total em ratos submetidos a retalhos cutâneos isquêmicos. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 1, p. 18-26, 2004.
- DANG, N.H.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KIM, H.P.; BAE, K.; KANG, S.S. Inhibitory constituents against cyclooxygenases from *Aralia cordata* Thunb. **Arch Pharm Res.**, v.28, n.1, p.28-33, Jan. 2005.
- DAVID FILHO, R.; MORAES, M. R. de S.; SILVA, J. C. C. B. GABRIEL JUNIOR, A.; ULIAN, M.; MIRANDA JUNIOR, F.; BURIHAN, E. Bloqueio das moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) na prevenção da lesão de reperfusão na musculatura esquelética de ratos Wistar EPM-1. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 6, p. 590-596, 2004.
- DAVINO, S.C.; GIESBRECHT, A.M.; ROQUE, N.F. Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivate substituted on carbon-15. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.22, p.1127-1129, 1989.
- DE MELO, A.C.; COTA, B.B.; DE OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. HPLC. quantitation of kaurene diterpenes in *Xylopi*a species. **Fitoterapia.**, v.72, p. 40-45, 2001.
- DEBATS, I.B.J.; BOOI, D.I.; WEHRENS, K.M.E.; CLEUTJENS, J.; DEUTZ, N.E.P.; HOGEN, V.E.; BEMELMANS, M.; VAN DER HULST, R.R.W.J. Oral Arginine Supplementation and the Effect on Skin Graft Donor Sites: A Randomized Clinical Pilot Study. **J Burn Care Res**, v.30, p.417-426, 2009.
- DEL CASTILHO, M. I. C. **Bras. PI BR 93** 01/950, 1993.
- DHAR, I.; DHAR, A.; WU, L.; DESAI, K. Arginine Attenuates Methylglyoxal- and High Glucose-Induced Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress by an Endothelial Nitric-Oxide Synthase-Independent Mechanism. **The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics.**, v.342, n.1, p.196-204, 2012.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 47-95 , Jan. 2002.
- DROVER, J.W.; DHALIWAL, R.; WEITZEL, L.; WISCHMEYER, P.E.; OCHOA, J.B.; HEYLAND, D.K. Perioperative use of arginine-supplemented diets: a systematic review of the evidence. **J Am Coll Surg.**, v.212, p.385-399, 2011.
- DUCKE, A. **As leguminosas da Amazônia Brasileira**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1939.
- DUPONT, J.J.; FARQUHAR, W.B.; TOWNSEND, R.R.; EDWARDS, D.G. Ascorbic acid or L-arginine improves cutaneous microvascular function in chronic kidney disease. **J Appl Physiol**, v.111, p.1561-1567, 2011.

DURANTE, W.; JOHNSON, F.K.; JOHNSON, R.A. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v.34, n.9, p.906-911, 2007.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. das G. Revisão sobre óxido nítrico. **J. Bras. Med. Patol. Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-360, 2003.

DWYER, J. D. **Brittonia**, v. 7, p.143, 1951.

EKMEZ, F.C.; PURTULOGLU, T.; AYDEMIR, G.; AYDINOZ, S.; FIDANCI, K.; KARAOGU, A.I.; BABACAN, O.; CANPOLAT, F.E.; ETINKAYA, M.C.; TUNC, T.; SULEYMANOGLU, S.S. Comparing beneficial effects of inhaled nitric oxide to L-arginine in necrotizing enterocolitis model in neonatal rats. **Pediatr Surg Int.**, v.28, p.1219-1224, 2012.

ELSAIR, J. Effect of arginine chlorhydrate on nitrogen balance during the three days following routine surgery in man. **Biomedicine**, v.29; p.312-7, 1978.

EL-SHEIKH, N.M.; KHALIL, F.A. L-Arginine and L-glutamine as immunonutrients and modulating agents for oxidative stress and toxicity induced by sodium nitrite in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.758-762, 2011.

ENTSAR, A.S. Curative and protective effects of L-arginine on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.423, p.147-151, 2012.

ERSOY, A.; SEVIN, K.; SEVIN, A.; SEREL, S. Effects of clopidogrel on survival of rat skin flaps. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v. 60 , n. 8 , p. 861-863, 2007.

ESTEVEZ JUNIOR, I.; MASSON, I.B.; FERREIRA, L.M. LIEBANO, R.E.; BALDAN, C.; GOMES, A.C. Administração tópica de cloridrato de hidralazina na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 2, p. 164-167, 2005.

ESTEVEZ JUNIOR, I.; FERREIRAL, M.; LIEBANO, R.E. Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por iontoforese na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 6, p. 626-629, 2004.

FAINTUCH, J. Efeitos cardiovasculares da arginina e do óxido nítrico. **Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo**, v. 50, p. 334-38, 1995.

FELICITY, N. E.; GAVINS, S. Y.; AHMAD, M. K.; RODERICK, J.F; PERRETTI, M. Leukocyte antiadhesive actions of annexin: ALXR- and FPR-related anti-inflammatory mechanisms. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4140-4147, May 2003.

FERNANDES, R. M.; PEREIRA, N. A.; PAULO, L.G. Anti-inflammatory of *Copaíba* balsam (*Copaifera cearenses*, Huber). **Rev. Bras. Farm.**, v. 73, p. 53, 1992.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, L. M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, supl. 2, p. 28-34, 2005.

FESTING, M. F. W. Suitability of the rat for different investigations. In: ALTMAN P. I.; KATS, D. D. (Ed.). **Inbred and genetically defined strains of laboratory animal, mouse and rat**. Bethesda: Fed. Am. Soc. Exp. Biol., 1979. v.1, p. 237-238,

FLEURY, M. **Acta Bot. Gallica**, v. 144, p. 473, 1997.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, v.46, n.3, p.265-71, 2000.

FONSECA, A.V.; FERREIRA, L.M.; GOMES, H.C.; PERCARIO, S. Terazosin and propranolol as blockers to the deleterious effect of nicotine in a random skin flap, in the rat. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 3, May/June 2004.

FRANCISCHETTI, I.; MAFFEI, F. H. de A.; BITU-MORENO, J. FUHRMANN NETO, M.; COELHO, M.P.V.; TSUKAI, F.H.; SEQUEIRA, J.L.; YOSHIDA, W.B. Ação do ácido trissódio-cálcio-dietilenotriaminopentaacético (cana3dtpa) nas lesões de isquemia-reperusão em membro posterior de rato. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, n. 5, p. 332-341, 2002.

FRANCISCO NETO, A.; SILVA, J. C. C. B.; FAGUNDES, D. J.; PERCÁRIO, S.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y.; MOREIRA NETO, A.A. Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperusão de membros posteriores. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 2, p. 134-139, 2005.

FREIRE, S.T.; FERREIRA, L.M.; GOMES, H.C.; PERCARIO, S. Uric acid as a monitor of oxidative stress in a random skin flap in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 6, p. 534-536, 2003.

FREITAS, C.V.; OLIVEIRA, P.E. Biologia reprodutiva de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae, caesalpinioideae). **Rev. Bras. Bot.**, v. 25, n. 3, p. 311-321, set. 2002.

FREITAS, F.A.S.; PICCINATO, C.E.; CAMPOS, A.D.; CHERRI, J. Estudo da isquemia e reperusão em retalhos cutâneos de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 17, supl.3, p. 74-78, 2002.

GARDNER, C.R.; LASKIN, J.D.; DAMBACH, D.M.; SACCO, M.; DURHAM, S.K.; BRUNO, M.K.; COHEN, S.D.; GORDON, M.K.; GERECKE, D.R.; ZHOU, P.; LASKIN, D.L. Reduced hepatotoxicity of acetaminophen in mice lacking inducible nitric oxide synthase: potential role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.184, p.27-36, 2002.

GHAVAMI, A.; NUTT, M.P.; HARDY, S.P. Heat shock protein and high-dose aspirin: effects on random skin flap survival in a rat model. **Ann. Plast. Surg.**, v. 48, n. 1, p.60-67, Jan. 2002.

GIERA, M.; LINGEMAN, H.; NIESSEN, W.M.A. Recent Advancements in the LC- and GC-Based Analysis of Malondialdehyde (MDA): A Brief Overview. **Chromatographia**, v.75, p.433-440, 2012.

GIL, F.; IGLESIA, R.; MENDOZA, L.; GONZALEZ, B.; WILKENS, M. Soil Bacteria are Differentially Affected by the Resin of the Medicinal Plant *Pseudognaphalium vira vira* and Its Main Component Kaurenoic Acid. **Microbial Ecology**, v.52, p.10-18, 2006.

GILBERT, B.; MORS, W. B.; BAKER, P. M. TOMASSINI, T. C.; PELLEGRINO, J. **An. Acad. Bras. Ci.**, v. 44, p. 423, 1972.

GOMES, H.C.; CAMPOS, J.H.O.; FERREIRA, L.M.; KOBAYASHI, L.A.; Experimental model to study the effect of nicotine in a random skin flap in the Rat. **Acta Cir. Bras.**, v.19, 2004.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P. MATHEUS, M.E.; FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **J. Ethnopharmacol.**, v. 109, p. 486-492, 2007.

GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian Northeast. **J. Essent. Oil Res.**, v. 17, p. 130-132, Mar./Apr. 2005.

GraphPad InStat® versão 3.00 para Windows. San Diego, Califórnia. Disponível em: <<http://www.graphpad.com>>. Acesso em: 1 Nov. 2007.

GraphPad Prism® versão 4.00 para Windows. San Diego, Califórnia. Disponível em:< <http://www.graphpad.com>>. Acesso em: 1 Nov. 2007.

GraphPad Software para Windows. San Diego, Califórnia. Disponível em: < <http://www.graphpad.com>>. Acesso em: 1 Nov. 2007.

GRIBBE, O.; SAMUELSON, U.E.; WIKLUND, N.P.; Effects of nitric oxide synthase inhibition on blood flow and survival in experimental skin flaps. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v. 60, n.3, p. 287-293, 2007.

GUIMARÃES, M.V.T.N.; MOREIRA, G.H.G.; ROCHA, L.P.; NICOLUZZI, J.E.L.; SOUZA, C.J.F.; REPKA, J.C.D. Ação da l-arginina na evolução de retalhos cutâneos de ratos sob exposição à nicotina. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.40, n.1, p.49-54, 2013.

HAKAN, A.; ALI GURLEK, A.; HAKAN, P.; ASKAR, I.; BAY-KARABULUT, A.; AYDOGAN, L.; FARIZ, A.; ACET, A. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the ischaemia-reperfusion injury in rat skin flaps. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v., n., p. 1-6, 2006.

HALFOUN, V. L. R. C.; FERNANDES, T. J.; PIRES, M. L. E. BRAUN, E.; CARDOZO, M.G.T.; BABBOUT, G.C. Estudos morfológicos e funcionais da microcirculação da pele no Diabetes *Mellitus*. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 47, n. 3, p. 271-279, jun. 2003.

HAMAR, J.; RÁCZ, I.; ČÍ, M. ; LOJEK, A.; PALLINGER, E.; FUREZZ. Time course of leukocyte response and free radical release in an early reperfusion injury of the superior mesenteric artery. **Physiol. Res.**, v. 52, p. 417-423, 2003.

HART, K.; BAUR, D.; HODAM, J.; LESOON-WOOD, L.; PARHAM, M.; KEITH, K.; VASQUEZ, R.; AGER, E.; PIZZARRO, J. Short- and long-term effects of sildenafil on skin flap survival in rats. **Laryngoscope**, v. 116, n., p. 522-528, Apr. 2006.

HOSNUTER, M.; KARGI, E.; PEKSOY, I.; BABUCC, O.; PAYASLI, C. An ameliorated skin flap model in rats for experimental research. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v. 59, p. 299-303, 2006.

HUANG, S.- S.; WEI, F.- C.; HUNG, L.- M. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte – endothelial cell interactions role of nitric oxide and protein kinase. **C. Circ. J.**, v. 70, p. 1070–1075, 2006.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutathiona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v. 31, n.5, p. 1170-1179, 2008.

HUEMER, G. M.; WECHSELBERGER, G.; OTTO-SCHOELLER, A. GURUNLUOGH, R.; PIZA-KATZER, H.; SCHOELLER, T. Improved dorsal random-pattern skin flap survival in rats with a topically applied combination of Nonivamide and Nicoboxil. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 111, n. 3, p. 1207-1211, Mar. 2003.

JAIMES, E. A.; SWEENEY, C.; RAIJ, L. Endothelial nitric oxide production effects of the reactive oxygen species hydrogen peroxide and hypochlorite on endothelial nitric oxide production. **Hypertension**, v. 38, p. 877-883, 2001.

JORDÃO JÚNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathiona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 434-449, jul./set. 1998.

KALBE, C.; BÉRARD, J.; PORM, M.; REHFELDT, C.; BEE, G. Maternal L-arginine supplementation during early gestation affects foetal skeletal myogenesis in pigs. **LivestockScience**, v.157, p.322-329, 2013.

KAMIMURA, H. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by (-)-ent-Kaur-16-en-19-oic acid and its derivatives. **Planta Med.**, v.69, n.6, p.555-556, June 2003.

KANDEEL, S.; EL-DEEB, T.; SALAH, E.; EL-BAKARY, N.; SARHAN, N.; BALAHA, M.; SAKAI, H.; YANA, T. L-arginine protects against ethylene glycol-induced gastric mucosal damage in rats: immunohistochemical and electron microscopic study. **Turk J Biol.**, v.37, p.342-349, 2013.

KELLY, C.P.; GUPTA, A.; KESKIN, M.; JACKSON, I.T. A new design of a dorsal flap in the rat to study skin necrosis and its prevention. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v.63, p.1553 e 1556, 2010.

KHALIL, A.A.; AZIZ, F.A.; HALL, J.C. Reperfusion Injury. **Reperfusion Injury**, v.117, n. 3, p1024-1033, 2006.

KHANG, R.; HELMS, R.; STOUT, M JABER, H.; NAKATSU, T. **J. Agric. Food Chem.**, v. 40, p. 2328, 1992.

KHAZAEI, M.; MOSHAYEDI, M.A.; JERVEKANI, M.T.; AGHILI, S.; MONTAZERI, S.; DASTJERDI, R.M.; HASHEMZEHI, F.; JAZI, H.H. Effect of L-arginine and L-NAME on coronary angiogenesis in male diabetic rats. **Journal of Research in Medical Sciences**, v.2, p.247-251, March 2012.

KIEM, P.V; CAI, X. F; MINH, C.V; LEE, J.J; KIM, Y.H. Kaurane-type diterpene glycoside from the stem bark of *Acanthopanax trifoliatum*. **Planta Med.** v.70, n.3, p.282-284, Mar. 2004.

KIRK, S. J.; BARBUL, A. Role of arginine in trauma, sepsis and immunity. **JPEN**, v.14, n.(5suppl), p.227-38, 1990.

KLEBANOFF, S.J. *et al.* Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v.93, p.185-198, Feb. 2013.

KOCHAR, N.I.; UMATHE, S.N. Beneficial effects of L-arginine against diabetes-induced oxidative stress in gastrointestinal tissues in rats. **Pharmacological Reports**, v.61, p.665-672, 2009.

KOCHAR, N.I.; UMATHE, S.N. Beneficial effects of L-arginine against diabetes-induced oxidative stress in gastrointestinal tissues in rats. **Pharmacological Reports**, v61, p.665-672, 2009.

KOMOROWSKA-TIMEK, E.; TIMEK, T.A.; BREVETTI, L.S. SZUBA, A.; STUELINGERM.; HARDESTY, R.A; BUNCKE, H.J. Oral administration of L-Arginine decreases necrosis of the epigastric skin flap in the rat. **Ann. Plast. Surg.**, v. 53, n.1, p. 73-78, July 2004.

KOPPELMANN, T.; POLLAK, Y.; MOGILNER, J.; BEJAR, J.; CORAN, A.G.; SUKHOTNIK, I. Dietary L-arginine supplementation reduces Methotrexate-induced intestinal mucosal injury in rat. **BMC Gastroenterology**, v. 12 , n. 30, p.12:41, 2012.

LACEY, L.A.; SCHRECK, C. E.; MCGOVERN, T. P. **Mosquito News**, n. 41, p. 376, 1981.

LAINE, L.; WEINSTEIN, W.M. Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. **Gastroenterology**, v.94, n.6, p.1254-62, 1988.

LEANDRO, L.M.; VARGAS, F.S.; BARBOSA, P.C.S.; NEVES, J.K.O.; SILVA, J.A.; VEIGA-JÚNIOR, V.F. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) **Oleoresins. Molecules**, v.17, p.3866-3889, 2012.

LEITE, A. M. C.; LLERAS, E. **Acta Bot. Bras.**, v. 7, p. 61,1993.

LEON, P. Arginine supplementation improves histone and acute phase protein synthesis during gram-negative sepsis in the rat. **JPEN**, v.15, p.503, 1991.

LIEBANO, R.E.; ABLA, L.E.; FERREIRA, L.M. Efeito da estimulação elétrica nervosa transcutânea em alta frequência na viabilidade do retalho cutâneo randômico em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v.21, n.3, p.133-138, 2006.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev. Bras. Ci. Farm.**, v. 37, n. 3, p. 293-303, set./dez., 2001.

LIMA, J.M.; SILVA, A.S.; ALVES, N.F.; PORPINO, S.K.; ALMEIDA, R.T.; LIMA. L-arginina aumenta a produção endotelial de óxido nítrico e reduz a pressão arterial de repouso sem alterar as respostas pressóricas do exercício. **Motricidade**, v.8, n.3, p.19-29, 2012.

LINEAWEAVER, W.C.; LEI, M.P.; MUSTAIN, W.; OSWALD, T.M.; CUI, D.; ZHANG, F. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. **Ann. Surg.**, v. 239, n. 6, p. 866 - 875, June 2004.

LIZARTE NETO, F.S. Kaurene diterpene induces apoptosis in U87 human malignant glioblastoma cells by suppression of anti-apoptotic signals and activation of cysteine

proteases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, p. 71-78, 2013.

LOBENHOFFER, J.M.; BODE-BÖGER, S. Mass spectrometric quantification of L-arginine and its pathway Related substances in biofluids: The road to maturity. **J. Chromatogr.**, v.B, n.964, p.89–102, 2014.

LORENZI H. **Árvores brasileiras**. 4. ed. [S.l.]: Instituto Plantarum de Estudos e Flora, 2002.

LYSIAK, J. J.; TURNER, S. D.; NGUYEN, Q. A.T. SINGBARTL,K.; LEY, K.; TURNER, T.T. Essential role of neutrophils in germ cell-specific apoptosis following ischemia/reperfusion injury of the mouse testis. **Biol. Reproduct.**, v. 65, p. 718–725, 2001.

LYU, J.H. *et al.*. Ent-kaur-16-en-19-oic acid, isolated from the roots of *Aralia continentalis*, induces activation of Nrf2. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p.1442–1449, 2011.

MAIA, L.B.; MOURA, J.J.G. How Biology Handles Nitrite. **Chem. Rev.**, v.114, p.5273–5357, 2014.

MANFREDINI, V.; ROEHRS, R.; PERALBA, M.C.R. HENRIQUES, J.A.P.; SAFFI, J.; RAMOS, A.I.I.P.; BENFATO, M.S. Glutathione peroxidase induction in superoxide dismutase mutants. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 159-165, 2004.

MARCATI, C. R.; ANGYALOSSY-ALFONSO, V.; BENETATI, L. Anatomia comparada do lenho de *Copaifera langsdorffii* Desf. (*Leguminosae-Caesalpinioideae*) de floresta e cerrado. **Rev. Bras. Bot.**, São Paulo, v. 24, n. 3, p. 311-320, set. 2001.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J Biol Chem**. v.268, n.17, p.1231-1234, 1993.

MASSCHELEIN-KLEINER, L. **Ancient biding media, varnishes and adhesives**. Rome: ICCROM, 1995.

MATTA, A. A. **Flora médica braziliense**. Manaus: Imprensa Oficial, 1913.

MATTOS-FILHO, A.; RIZZINI, C.T.; MAUTONE, L.; GUIMARÃES, E. F. **Árvores do jardim botânico**. Rio de Janeiro: Ed. Lidador, 1993.

MAUAD JR, R.J.; SHIMIZU, M.H.M.; MAUAD, T. TOLOSA, E.M.C. Buflomedil and Pentoxifyline in the viability of dorsal cutaneous flaps of rats treated with Nicotine. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v. 59, p. 387-392, 2006.

McDONALD, W.S.; THURMOND, M.; JONES, C.; COHEN, R.; MILLER, A.; BEASLEY, D. Role of Nitric Oxide in Skin Flap Delay. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.113, n. 3, p. 927-931, Mar. 2004.

McFARLANE, R.M.; DeYOUNG, G.; HENRY, R.A. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.35, n.2, 1965.

MEDEIROS, D. F.; XAVIER FILHO, L.; BARBOSA FILHO, J. M. **Bol. Soc. Brot. Ser.** **2**, v. 58, p. 43, 1985.

MEDINA, J.M. *et al.*, Evaluation of the molluscicidal and *Schistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19 n.1B, p.207-211, Jan./Mar. 2009.

MEDINA, J.M.; PEIXOTO, J.L.B.; SILVA, A.A.; HARAGUCHI, S.K.; FALAVIGNA, D.L.M.; ZAMUNER, M.L.M.; SARRAGIOTTO, M.H.; VIDOTTI, G.J. Evaluation of the molluscicidal and *Schistosoma mansoni* cercariae activity of *Croton floribundus* extracts and kaurenoic acid. **Revista Brasileira de Farmacognosia - Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.1B, p.207-211, Jan./Mar. 2009.

MEIRER, R.; HUEMER, G.M.; OEHLBAUER, M. WANNER, S.; PIZA-KATZER; KAMILGER, F.S. Comparison of the effectiveness of gene therapy with vascular endothelial growth factor or shock wave therapy to reduce ischaemic necrosis in an epigastric skin flap model in rats. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, v.60, p.266-271, 2007.

MELO, A.C.; COTA, B.B.; OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F.C. HPLC quantitation of kaurene diterpenes in *Xylopi* species. **Fitoterapia**, v.72, p.40-45, 2001.

MENDONÇA, F.A.C. de; SILVA, K. F. S.; SANTOS, K. K. dos. RIBEIRO JUNIOR, K.A.L.; SANT'ANA, A.E.G. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 629–636, 2005.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thio-barbituric acid test. **Anal Biochem.**, v.86, n.1, p.271-8, 1978.

MIZOKAMI, S.S. *et al.*, Kaurenoic Acid from *Sphagneticola trilobata* Inhibits Inflammatory Pain: Effect on Cytokine Production and Activation of the NO–Cyclic GMP–Protein Kinase G–ATP-Sensitive Potassium Channel Signaling Pathway. **J. Nat. Prod.**, v.75, p.896–904, 2012.

MONTI, L.D.; SETOLA, E.; LUCOTTI, P.C.G.; MARROCCO-TRISCHITTA, M.M.; COMOLA, M.; GALLUCCIO, E.; POGGI, A.; MAMM, S.; CATAPANO, A.L.; COMI, G.; CHIESA, R.; BOSI, E.; PIATTI, P.M. Effect of a long-term oral L-arginine supplementation on glucose metabolism: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.14, p.893-900, 2012.

MORRIS, G. *et al.* The Glutathione System: A New Drug Target in Neuroimmune Disorders. **Mol Neurobiol.**, v.50, p.1059–1084, 2014.

MORS, W.; RIZZINI, C.T. **Useful plants of Brazil**. San Francisco: Holden Day, 1966.

- MURATA, A.; SEKUYA, K.; WATANABE, Y. YAMAGUCHI, F.; HATANO, N.; IZUMORI, K.; TOKUDA, M. A novel inhibitory of D-allose on production of reactive oxygen species from neutrophils. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 96, n. 1, p. 89-91, 2003.
- NAKA, Y.; BUCCIARELLI, L.G.; WENDT, T.; LEE, L.K.; RONG, L.L.; RAMASAMY, R. RAGE axis: animal models and novel insights into the vascular complications of diabetes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.24, n.8, p.1342-9, 2004.
- NEILLY, P.J.D.; KIRK, S.J.; GARDINER, K.R.; ROWLANDS, B.J. The L-arginine/nitric oxide pathway-biological properties and therapeutic applications. **Ulster Med J.**,v.62, p.193-200, 1994.
- NGAMRO, J.; NAVANICH, N.; SIRIMONGKON, S.; ROENGSUMRAN, S.; PETSOM, A.; KAMIMURA, H. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by (-)-ent-Kaur-16-en-19-oic acid and its derivatives. **Planta Med.** v.69, n. 6, p.555-556, June 2003.
- NOGUCHI, A.; REIS, J. M. C. dos; DIAS, C. S. Níveis séricos de aminotransferases, bilirrubinas e gama-glutamil transpeptidase após a administração de óleo de copaíba em ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 17, n. 2 mar./abr. 2002.
- NORA, M.; SHEIKH, E.L.; KHALIL, F.A. L-Arginine and L-glutamine as immunonutrients and modulating agents for oxidative stress and toxicity induced by sodium nitrite in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.758-762, 2011.
- NOVAES, M.R.C.; BEAL, F.L.R. Farmacologia da L-arginina em pacientes com câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.50, n.4, p.321-325, 2004.
- NOVO, N.F.; JULIANO, Y.; MOREIRA NETO, A.A. Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 2, p. 134-139, 2005.
- OKOYE, T.C.; AKAH, P.A.; OMEJE, E.O.; OKOYE, F.B.C.; NWORU, C.S. Anticonvulsant effect of kaurenoic acid isolated from the root bark of *Annona senegalensis*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.109, p.38-43, 2013.
- OKUYAMA, E; NISHIMURA, S; YAMAZAKI, M. Analgesic principles from *Aralia cordata* Thunb. **Chem Pharm Bull** (Tokyo), v.39, n.2, p.405-407, Feb. 1991.
- OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D. de; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Rev. Bras. Bot.**, v. 25, n. 3, p. 331-338, set. 2002.
- OLIVEIRA, C.M.B. *et al.* Citocinas e Dor. **Rev Bras Anesthesiol**, v.61, n.2 p.255-265, 2011.
- OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera spp.*) no município de Moju, PA. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 8, n. 3, p.14-23, 2006.
- OSHAKI, A.; YAN, L.T.; ITO, S EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y.; BIOORG. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 4, p. 2889,1994.

- PADDON-JONES, D.; BORSHEIM, E.; WOLFE, R.R. Potential ergogenic effects of arginine and creatine supplementation. **J Nutr.**, v.134, n.10 (suppl), p.2888-2894, 2004.
- PAIVA, L.A.; GURGEL, L.A.; CAMPOS, A.R.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sci.**, v.75, n.16, p.1979-87, Sep. 2004.
- PAIVA, L.A.; GURGEL, L.A.; CAMPOS, A.R.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sci.** v.75, n.16, p.1979-87, Sep. 2004a.
- PAIVA, L.A.; GURGEL, L.A.; DE SOUSA, E.T.; SILVEIRA, E.R.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **J Ethnopharmacol.** v.93, n.1, p. 51-56, July 2004b.
- PAIVA, L.A.; GURGEL, L.A.; SILVA, R.M.; TOME, A.R.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascul Pharmacol.**, v.39, n.6, p.303-307, Dec. 2002.
- PAIVA, L.A.; GURGEL, L.A.; SOUSA, E.T.; SILVEIRA, E.R.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Protective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin against acetic acid-induced colitis in rats. **J Ethnopharmacol.** v.93, n.1, p.51-56, July 2004.
- PAIVA, L.A.; RAO, V.S.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **J Ethnopharmacol.**, v.62, n.1, p.73-78, Aug. 1998.
- PAIVA, L.A.F. *et al.* Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v.39, p.303-307, 2003.
- PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; CAMPOS, A.R.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced intestinal injury by oleo-resin from *Copaifera langsdorffii* in rats. **Life Sci.** v.75, p.979-1987, 2004.
- PAIVA, L.A.; RAO, V.S.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. Gastroprotective effect of *Copaifera langsdorffii* oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **J Ethnopharmacol.**, v.62, n.1, p.73-78, Aug. 1998.
- PALMER, R.M.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v.333, p.664-666, 1988.
- PEDRONI, F.; SANCHEZ, M.; SANTOS, F. A. M. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. – Leguminosae, Caesalpinioideae) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. **Rev. Bras. Bot.**, v. 25, n. 2, p. 183-194, jun. 2002.
- PENNA, M. **Dicionário brasileiro de plantas medicinais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Liv. Kosmos, 1946.
- PERROT, E. **Matières premières usuelles usuelles de rezime végétal**. Paris: Masson & Cia., 1943.

PICCINATO, C. E.; DOMENICO JR, A.; JORDÃO JR, A. A.; VANNUCCHI, H. Isquemia e reperfusão do músculo esquelético aumenta a peroxidação lipídica em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 5, 2004.

PINTO, S.I. do C.; SOUZA, A. M. de; CARVALHO, D. de. Variabilidade Genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorfii* desf em dois fragmentos de mata ciliar. **Sci. Florestalis**, n. 65, p. 40-48, June, 2004.

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931.

PRADO, P.; LIEBANO, R. E.; HOCHMAN, B.; PINFILDI, C. E.; FERREIRA, L. M. Modelo experimental para laserterapia de baixa intensidade em retalho cutâneo randômico isquêmico em ratos. **Acta Cir. Brás.**, v. 21, n. 4, p. 258-262, 2006.

PYTEL, R.F.; SILVA, L.V.N.; NUNES, A.S.; Estudo *in vivo* de atividade anti-radicalar por quantificação de peróxidos cutâneos. **An. Bras. Dermatol.**, v. 80, supl. 3, p. S323-S328, 2005.

RATNER, S. Enzymes of arginine and urea synthesis. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.**, v.39, p.1-90, 1973.

RHODEN, E. L.; TELÖKEN, C.; SOUTO, C. A. V.; RHODEN, C. A. LUCAS, M.L.; BELLÓ-KLEIN, A. . Effects of L-arginine and L-name on renal ischemia - reperfusion in rats. **Braz. J. Urol.**, v. 27, n. 1, p. 78-83, Jan./ Feb. 2001.

RIAZ, A. A.; WANG, Y.; SCHRAMM, R. SATO, T.; MENGER, M.D.; JEPSSONB.; THORLACIUS, H. Role of angiotensin II in ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelium interactions in the colon. **FASEB J.**, 10.1096/fj. 03-050/fje. Publisehd on line Mar. 2004.

RISHI, P.; BHARRHAN, S.; SINGH, G.; KAUR, I.P. Effect of Lactobacillus plantarum and L-arginine against endotoxin-induced liver injury in a rat model. **Life Sciences.**, v.89, p.847-853, 2011.

RODRIGUES, J. B. **Hortus Fluminensis**. Rio de Janeiro: [s.n.], 1894.

RODRIGUES, R. M. **A flora da Amazônia**. Belém: Ed. Cejup, 1989.

ROMAN, R.M.; WENDLAND, A.E.; POLANCZYK, C.A. Mieloperoxidase e Doença Arterial Coronariana: da Pesquisa à Prática Clínica. **Arq Bras Cardiol.**, v.91, n.1, p. e12-e19, 2007.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SAAD, E.A. Curative and protective effects of L-arginine on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.423, p.147-151, 2012.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; WINTER, J.; WOOF, C.J. Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.**, v.115, n.7, p.1265-75, Aug. 1995.

SALEM, N.A.; SALEM, E.A.; MAAROUF, A.M.; KAMEL, M.; ELGALALY, H.; RADWAN, M.; EL-DAYEM, W.A.A.; EIA, M. Protective effect of trapidil and L-arginine against renal and hepatic toxicity induced by cyclosporine in rats. **Renal Failure**, v.32, p.959-968, 2010.

SANTOS, A.O.; IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil, **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.108, n.1, p.59-64, Feb. 2013.

SANTOS, C. H. M. dos; PONTES, J. C. D. V.; GOMES, O. M. Terapêutica medicamentosa na isquemia e reperfusão mesentérica: revisão da literatura. **Rev Bras. Coloproct.**, v. 26, n. 1, p. 28-33, jan./mar. 2006.

SARIFAKIOGLU, N.; GOKREM, S.; ATES, L.; AKBUGA, U. B. ASLAN, G. The influence of sildenafil on random skin flap survival in rats: an experimental study. **Br. Assoc. Plast. Surg.**, v.57, p.769-772, 2004.

SARTORI, M.R.; PRETTO, J.B.; CRUZ, A.B.; BRESCIANI, L.F.; YUNES, R.A.; SORTINO, M.; ZACCHINO, S.A.; CECHINEL, V.F. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). **Pharmazie.**, v.58, n.8, p.567-569, Aug. 2003.

SCHANAIDER A.; SILVA, P.C. Uso de animais em cirurgia experimental. **Acta Cir. Bras.**, v. 19, n. 4, p. 441-447, jul./ago. 2004.

SCHANAIDER, A.; MENEZES, V. J. M. T.; BORCHARDT, A. C.; OLIVEIRA, P. L. de; MADI, K. Proteínas teciduais oxidadas após lesão intestinal por reperfusão em ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 6, p. 434-436, 2005.

SCHANAIDER, A.; OLIVEIRA NETO, A. A. de; COSTA, I. R. da. Mannitol in reperfusion skin island flaps injury. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 14, n. 3, set. 1999.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v.25, n.1, p.1192-1205, 1968.

SEIFTER, E.; RETTURA, G.; BARBUL, A.; LEVENSON, S.M. Arginine: an essential amino acid for injured rats. **Surgery.**, v.84, n.2, p.224-30, 1978.

SHUKLA, A.; RASIK, A.M.; SHANKAR, R. Nitric oxide inhibits wound collagen synthesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.200, p. 27-33, 1999.

SILVA JR, O. de C. E.; CENTURION, S.; PACHECO, E.G. BRISOTTI, J.L.; OLIVEIRA, A.F.; DAL SASSO, K. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cir. Brás.**, v. 17, supl. 3, p. 96-100, 2002.

- SILVA, J. A.; MACEDO, M. L. R.; NOVELLO, J. C. MARANGONI, S. Biochemical characterization and N-terminal sequences of two new Trypsin inhibitors from *Copaifera langsdorffii* seeds. **J. Protein Chem.**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2001.
- SILVA, J. R. M. **Plantas medicinais e industriaes**. Rio de Janeiro: [s.n.], 1923.
- SILVA, J. R. M. **Contribuição para o estudo da flora brasileira**. Rio de Janeiro: [s.n.], 1911.
- SILVA, J. R. M. **O Brasil e suas possibilidades**. Rio de Janeiro: [s.n.], 1951.
- SILVA, J.J.L. *et al.* Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on Ischemia-Reperfusion of Randomized Skin Flaps in Rats. **Aesth Plast Surg.**, v.33, p.104-109, 2009.
- SILVA, M. G.; CASTRO, A. A.; RAMOS, E. A. G. PEIXOTO, E.; MIRANDA JR., F.; PITTA G.B.B.; COSTA, R.F.; JULIANO, Y. Efeitos histológicos e bioquímicos séricos do alfa-tocoferol na lesão de isquemia e reperfusão em membro pélvico de ratos. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 5, p. 375-381, 2005.
- SILVEIRA, L.R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 48, n. 6, p. 812-822, dez. 2004.
- SILVEIRA, M.; YOSHIDA, W.B. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismos de lesão e perspectivas de tratamento. **J. Vasc. Br.**, v.3, n.4, p.367-378, 2004.
- SIMMAN, R.; CRAFT, C.; MCKINNE, B. Improved survival of ischemic random skin flaps through the use of bone marrow nonhematopoietic stem cells and angiogenic growth factors. **Ann. Plast. Surg.**, v. 54, n. 5, p. 546-552, May 2005.
- SIMONETTI, G. **MacDonald Encyclopedia of Herbs and Spices**. Verona: MacDonald & CO, 1991.
- SINGH, Z.; KARTHIGESU, I.P.; SINGH, P.; KAUR, R. Use of Malondialdehyde as a Biomarker for Assessing Oxidative Stress in Different Disease Pathologies: a Review. **Iranian J Publ Health**, v. 43, Suppl. n.3, p. 7-16, Oct 2014.
- SLIMESTAD, R.; MARSTON, A.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. **Planta Méd.**, v.61, p.562-563, 1995.
- SOMOVA, L.I; SHODE, F.O; MOODLEY, K.; GOVENDER, Y. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopia aethiopic* and *Alepidea amatymbica*. **J Ethnopharmacol.**, v.77, n.2-3, p.165-74, Oct. 2001.
- SOUZA FILHO, M.V.P.; LEAL, P.R.L.; SBALCHIERO, J.C.; MARQUES, M.J.M. Efeito do extrato de Ginkgo Biloba na sobrevida de retalhos cutâneos em ratos. **Rev. Soc. Bras. Cir. Plast.**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 45-56, maio/ago. 2002.
- SOUZA, A. F. R. D.; ABREU, C. L. B. **Arq. Jard. Bot.**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 93, 1977.
- SOUZA-MORAES, M. R.; DAVID-FILHO, R.; SILVA, J.C.C.B. ULIAN, M; FRANCO, M.F.; GABRIEL JUNIOR, A.; SMITH, B.; BURIHAN, E. Effect of antibodies to

intercellular adhesion molecule type 1 on the protection of distant organs during reperfusion syndrome in rats. Effect of anti-ICAM-1 on reperfusion syndrome. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p. 605-612, 2003.

SUDA, C. N. K.; GIORGINI, J. F. Multiple forms of endo-1,4- β -glucanases in the endosperm of *Euphorbia heterophylla* L. **J. Exp. Bot.**, v. 54, n. 390, p. 2045-2052, Sept. 2003.

SUGIMOTO, H.; GRAHOVAC, G.; ZEISBERG, M.; KALLURI, R. Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenetic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors. **Diabetes**, v.56, n.7, p.1825-33, 2007.

SUN, T.; ZHOU, W.B.; LUO, X.P.; TANG, Y.L.; SHI, H.M. Oral L-arginine Supplementation in Acute Myocardial Infarction Therapy: A Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. **Clin. Cardiol.**, v.32, n.11, p.649-652, 2009.

THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS V. 342, n.1. Copyright © 2012 by The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

THEOPHINE, C.; OKOYE, A.; AKAH, P.A.; OMEJE, E.O.; OKOYE, F.B.C.; NWORU, C.S. Anticonvulsant effect of kaurenoic acid isolated from the root bark of *Annona senegalensis*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.109, n.38-43, 2013.

THIERRY, F.; STEPHAN, K.; SIGRID, G. PHILLIPE, N.; YVETTE, G.; FABRICE, P.; BERNARD, P.; GINETTE, D-D. Inhibitory effect of curcuminoids and tetrahydrocurcuminoids on equine activated neutrophils and Myeloperoxidase activity. **Physiol. Res.**, 2007. *In press*.

TIRAPELLI, C.R. *et al.* Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v.492, p. 233–241, 2004.

TIRAPELLI, C.R.; AMBROSIO, S.R.; COSTA, F.B.; COUTINHO, S.T.; OLIVEIRA, D.C.; OLIVEIRA, A.M. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **Eur J Pharmacol.**, v.492, n.2-3, p.233-241, May. 2004.

TIRAPELLI, C.R.; AMBROSIO, S.R.; COSTA, F.B.; OLIVEIRA, A.M. Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. **Fitoterapia**, v.73, n.1, p.56-62, Feb. 2002.

TIRAPELLI, C.R.; AMBROSIO, S.R.; COUTINHO, S.T.; OLIVEIRA, D.C.; COSTA, F.B.; OLIVEIRA, A.M. Pharmacological comparison of the vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid and pimaradienoic acid. **J Pharm Pharmacol.**, v.57, n.8, p.997-1004, Aug. 2005.

TIRAPELLI, C.R.; AMBROSIO, S.R.; DA COSTA, F.B.; DE OLIVEIRA, A.M. Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. **Fitoterapia**. v.73, n.1, p.56-62, Feb. 2002.

TORRES, J. M. de S.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. L. de. MARTINS, M.C.R.; CHAVES, C.R.; VASCONCELOS, P.R.C. de Efeitos metabólicos da l-alanil-

glutamina em ratos submetidos à isquemia da pata traseira esquerda seguida de reperfusão. **Acta Cir. Brás.**, v. 18, n. 1, p. 39-44, 2003.

TRATSOALPVOCH, Y.; GONON, A.T.; KISS, A.; YANG, J.; BÖHM, F.; TORNVALL, P.; SETTERGREN, M.; CHANNON, K.M.; SJÖQUIST, P.O.; PERNOWA, J. Myocardial protection by co-administration of L-arginine and tetrahydrobiopterin during ischemia and reperfusion. **International Journal of Cardiology**, v.169, p.83-88, 2013.

TSIKAS, D. Analysis of the L-Arginine/Nitric Oxide Pathway: The Unique Role of Mass Spectrometry. **Current Pharmaceutical Analysis**, v.1, p. 15-30, 2005.

TYNER, T.R.; SHAHBAZIAN, R.; NAKASHIMA, J.; KANE, S.; SIAN, K.; YAMAGUCHI, K.T. Propofol improves skin flap survival in a rat model: correlating reduction in flap-induced neutrophil activity. **Ann. Plast. Surg.**, v. 53, n. 3, p. 273-277, Sept. 2004.

UHLE, V. A.; PICCINATO, C. E.; CAMPOS, A. D.; CHERRI, J. Efeito do Meloxicam sobre a lesão de isquemia e reperfusão em músculo esquelético de ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 16, n. 4, out./nov./dez. 2001.

VALENCIA, A.; WENS, A.; PONCE-MONTER, H.; PEDRON, N.; GALLEGOS, A.J.; QUIJANE, A.J.; CALDERON, J.; GOMEZ, F.; RIOS, T. In vitro effect of kaurenoic acid isolated from *Montana frutescens* and two derivatives upon human spermatozoa. **J. Ethnopharmacol.**, v.18, p.89-94, 1986.

VAN DEN HEUVEL, M.G.W.; BUURMAN, W.A.; BAST, A.; VAN DER HULST, R.R.W.J. Review: ischaemiaereperfusion injury in flap surgery. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 62, p. 721e726, 2009.

VANNUCCHI, H.; IGLESIAS, A.C.R.G.; JORDÃO JR., A.A. Nutrição e avaliação do estado nutricional de animais de laboratório. In: SILVA JR., O.C. **Modelos experimentais de Pesquisa em Cirurgia**. São Paulo: Robe Editorial, 1998, cap. 8, p. 110-34.

VAREDI, M.; AKBARI, Z.; DEHGHANI, G.A.; TABELI, S.Z. Local Administration of L-Arginine Accelerates Wound Closure. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v.12, n.3-4, p.173-178, 2009.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.O GÊNERO *Copaifera*. **Quim. Nova**, v. 25, n. 2, p.273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V.F.; ROSAS, E.C.; CARVALHO, M.V.; HENRIQUES, M.G.M.O.; PINTO, A.C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulate* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—A comparative study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, p. 248-254, 2007.

VELIKOVA, A.; BANKOVA, V.; TSVETKOVAB, I.; KUJUMGIEVB, A.; MARCUCCI, M.C. Antibacterial *ent*-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. **Fitoterapia**, v.71, p.693-696, 2000.

VIEIRA, H.S.; TAKAHASHI, J.A.; OLIVEIRA, A.B.; BOAVENTURA, M.A.D. Novel Derivatives of Kaurenoic Acid: Preparation and Evaluation of their Trypanocidal Activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 13, n. 2, 151-157, 2002.

WANG, W.P.; GUO, X.; KOO, M.W.; WONG, B.C.; LAM, S.K.; YE, Y.N.; CHO, C.H. Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v.281, n.2, p.G586-94, 2001.

WEBSTER, R. S.; MONTERO, E. F. S.; FAGUNDES, D. J.; ZETTLER, C. G.; COIRO, J. O papel do condicionamento isquêmico do músculo grácil de ratos na fase precoce da reperfusão. **Acta Cir. Bras.**, v. 21, n. 2, p. 80-86, 2006.

WELLS, B.J.; EVERETT, C.J. Association between dietary arginine and C-reactive protein. **Nutrition**, v.21, p.125-130, 2005.

WIESINGER, H. Arginine metabolism and the synthesis of the nitric oxide. **Progress in Neurobiology**, v.64, p.365-391, 2001.

WILKENS, M.; ALARCON, C.; URZUA, A.; MENDOZA, L. Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene kaurenoic acid. **Planta. Med.**, v.68, p.452-454, 2002.

WOOD, H. C.; LAWALL, C. H. ; YOUNGKEN, H. W OSOL, A.; GRIFFITH, I.; GERSHENFELD, L. **The dispensatory of the United States of America**. 22nd ed. London: J.B. Lippincott Company, 1940.

WU, G.; MEININGER, C.J.; KNABE, D.A.; BAZER, F.W.; RHOADS, J.M. Arginine nutrition in development, health and disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.**, v.3, p.59-66, 2000.

YABE, Y.; KOBAYASHI, N.; NISHIHASHI, T.; TAKAHASHI, R.; NISHIKAWA, M.; TAKAKURA, Y. ; HASHIDA, M. Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 298, n. 3, p. 894-899, 2001.

YANG, Y.L.; CHANG, F.R.; WU, C.C.; WANG, W.Y.; WU, Y.C. New ent-kaurane diterpenoids with anti-platelet aggregation activity from *Annona squamosa*. **J Nat Prod.**, v.65, n.10, p.1462-1467, Oct. 2002.

YOSHIDA, W.B.; CAMPOS, E.B.P. de Isquemia e reperfusão de retalhos cutâneos: efeitos do manitol e vitamina C na redução de áreas de necrose em modelo experimental no rato. **Acta Cir. Bras.**, v. 20, n. 5, p. 358- 363, 2005.

ZHANG, Y.; HANDY, D. E.; LOSCALZO, J. Endothelial cells and protection against oxidative stress adenosine-dependent induction of glutathione peroxidase in human primary. **Circ. Res.**, v. 96, p. 831-837, 2005.

ZHANGA, F.; OSWALDA, T.; LINB, S. Vascular endothelial growth factor(VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. **Br. Assoc. Plast. Surg.**, v. 56, p. 653-659, 2003.

APÊNDICE A – Peso dos animais

Grupo Controle Salina (GC)		
T24	T48	T168
275	280	250
285	285	250
270	280	255
280	260	250
275	255	265
285	255	255

Grupo Ácido Caurenóico (AK)		
T24	T48	T168
250	250	245
225	265	250
230	260	245
255	275	240
230	260	245
255	275	240

Grupo L-Arginina (GA)		
T24	T48	T168
190	200	185
175	200	200
190	210	215
170	185	210
185	210	205
215	190	255

APÉNDICE B - Datos brutos (1)

TECIDO: IL-1		
Grupo Controle: Grupo GC		
GC_T24	GC_T48	GC_T168
471,0	271,0	213,5
338,5	398,2	241,0
496,0	466,0	198,0
218,5	218,5	234,1
316,0	316,0	218,5
308,2	326,1	151,7

TECIDO: IL-1		
Grupo Caurenóico: Grupo AK		
AK_T24	AK_T48	AK_T168
166,0	138,5	188,3
201,0	266,0	133,5
208,5	151,0	108,5
163,5	168,5	188,5
178,3	101,4	143,5
123,5	189,3	167,2

TECIDO: IL-1		
Grupo Arginina: Grupo GA		
GA_T24	GA_T48	GA_T168
138,5	271,0	196,0
266,0	238,3	191,0
351,0	366,0	268,5
168,5	218,5	291,0
361,0	156,3	116,0
363,5	189,3	221,5

TECIDO: TNF- α		
Grupo Controle: Grupo GC		
GC_T24	GC_T48	GC_T168
153	243	219,67
209,67	259,67	256,33
253	213	236,33
166,33	119,67	179,67
222,4	259,4	89,67
158,9	157,65	193

TECIDO: TNF- α		
Grupo Caurenóico: Grupo AK		
AK_T24	AK_T48	AK_T168
98,4	143	196,33
126,33	126,3	129,67
176,33	99,67	216,33
99,67	69,67	143
111,4	102,4	178,4
78,3	91,5	199,3

TECIDO: TNF- α		
Grupo Arginina: Grupo GA		
GA_T24	GA_T48	GA_T168
199,67	256,33	189,4
256,33	196,33	208,6
193	206,4	207,3
136,33	166,33	179,67
195,67	189,4	213
153	131,4	99,4

TECIDO: MDA		
Grupo Controle: Grupo GC		
GC_T24	GC_T48	GC_T168
0,056	0,031	0,023
0,076	0,034	0,041
0,052	0,043	0,021
0,045	0,022	0,027
0,051	0,021	0,012
0,056	0,036	0,035

TECIDO: MDA		
Grupo Caurenóico: Grupo AK		
AK_T24	AK_T48	AK_T168
0,012	0,017	0,045
0,014	0,013	0,043
0,009	0,015	0,012
0,015	0,021	0,034
0,009	0,009	0,022
0,01	0,012	0,032

DADOS BRUTOS (2)

TECIDO: MDA

Grupo Arginina: Grupo GA		
GA_T24	GA_T48	GA_T168
0,014	0,023	0,034
0,032	0,043	0,056
0,012	0,012	0,056
0,012	0,031	0,032
0,014	0,021	0,043
0,018	0,032	0,042

TECIDO: GSH

Grupo Controle : Grupo GC		
GC_T24	GC_T48	GC_T168
6,565	6,466	9,235
4,565	3,234	5,023
7,276	8,997	9,303
12,908	2,503	12,632
9,34	4,213	9,756
2,453	9,565	12,2343

TECIDO: GSH

Grupo Caurenóico: Grupo AK		
AK_T24	AK_T48	AK_T168
26,7657	19,95	19,71
23,02	23,82	12,9
16,15	19,25	7,53
25,565	14,4532	17,454
16,3455	24,3454	22,657
19,45	17,678	11,65567

TECIDO: GSH

Grupo Arginina: Grupo GA		
GA_T24	GA_T48	GA_T168
6,345	17,65	6,4534
16,32	6,34523	4,546
12,4356	17,353	7,235
19,5232	15,235	7,234
13,456	15,352	9,234
19,345	4,345	5,346

TECIDO: MPO

Grupo Controle : Grupo GC		
GC_T24	GC_T48	GC_T168
6,987	6,401	2,678
5,908	1,195	5,655
1,345	5,676	0,263
3,934	3,7134	1,619
1,354	3,544	4,565
6,343	2,566	0,4556

TECIDO: MPO

Grupo Caurenóico: Grupo AK		
AK_T24	AK_T48	AK_T168
0,46	1,323	2,1333
1,551	1,3345	2,123
1,034	0,4123	4,263
0,8655	0,123	0,76563
0,636	0,978	1,324
0,654	0,234	3,123

TECIDO: MPO

Grupo Arginina: Grupo GA		
GA_T24	GA_T48	GA_T168
3,834	4,34324	1,379
4,784	1,809	3,834
1,767	2,253	0,568
2,126	5,565	3,542
4,152	2,3456	1,556
5,784	1,345	3,545

TECIDO: Nox

Grupo Controle : Grupo GC		
GC_T24	GC_T48	GC_T168
11,216	6,622	3,919
14,730	1,813	2,125
19,595	2,750	4,625
18,514	7,125	3,063
7,162	-0,375	-2,875
10,405	5,250	0,875

DADOS BRUTOS (3)

TECIDO: Nox

Grupo Caurenóico: Grupo AK

AK_T24	AK_T48	AK_T168
6,892	1,216	6,081
6,622	2,438	6,500
9,324	7,750	0,563
4,459	0,875	-6,313
2,297	2,750	3,375
10,405	5,563	5,875

TECIDO: Nox

Grupo Arginina: Grupo GA

GA_T24	GA_T48	GA_T168
5,000	3,919	11,486
4,459	-0,687	11,188
6,081	1,500	0,875
5,270	0,875	11,813
2,568	5,875	23,375
-0,405	-3,813	24,625

ANEXO A – Estudos experimentais

Autor(es)	Drogas Estudadas
Schanaider <i>et al.</i> , 1999	Manitol
Biondo-Simões <i>et al.</i> , 2000	Buflomedil
Acevedo-Bogado <i>et al.</i> ,2002	Hialuronidase
Souza Filho <i>et al.</i> , 2002	Ginkgo Biloba
Ghavami,A.;Nutt,M.P.; Hardy, S. P.; 2002	Aspirina
Huemer <i>et al.</i> , 2002	Óxido Nítrico
Mc Donald <i>et al.</i> , 2004	
Zhang <i>et al.</i> , 2003	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
Lineaweaver <i>et al.</i> , 2004	
Meirer <i>et al.</i> , 2007	
Komorowska-Timek <i>et al.</i> , 2004	L-Arginina
Atabay <i>et al.</i> , 2004	Lidocaína + Epinefrina
Tyner <i>et al.</i> , 2004	Propofol
Sarifakioglu <i>et al.</i> , 2004	Sildenafil
Hart <i>et al.</i> , 2006	
De Almeida <i>et al.</i> , 2004	Dimetil-Sulfóxido
Esteves Júnior;Ferreira; Liebano, 2004	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
Fonseca <i>et al.</i> , 2004	Terazosina e propranolol
Abla <i>et al.</i> , 2005	Acetilcisteína
Bittencourt <i>et al.</i> , 2005	Minoxidil
Yoshida; de Campos, 2005	Manitol e Vitamina C
Esteves Júnior <i>et al.</i> , 2005	Cloridrato de Hidralazina
Aydogan <i>et al.</i> , 2006	Ácido Caféico
Mauad Junior <i>et al.</i> , 2006	Buflomedil e Pentoxifilina
Ersoy <i>et al.</i> , 2007	Clopidogrel
Silva <i>et al.</i> , 2009	Óleo-resina de Copaíba

QUADRO 1 - Drogas utilizadas na prevenção das lesões oxidativas em retalhos de pele randomizados em ratos.

ANEXO B – Parecer de aprovação do comitê de ética em pesquisa

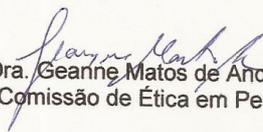
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 64/08, sobre o projeto intitulado: **“AÇÃO ANTI-RADICALAR DO ÁCIDO CAURENÓICO, DA L-ARGININA E DA AMINO Guanidina em Retalhos Cutâneos Randomizados em Dorsos de Ratos”**, de responsabilidade de JOAQUIM JOSÉ DE LIMA SILVA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 30 de setembro de 2008.

Fortaleza, 07 de outubro de 2008.


Prof. Dra. Geanine Matos de Andrade Cunha
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA